

## Литература

1. Аппаратно-программный комплекс "Visual" для автоматизации проведения процедуры баллонной ангиопластики / Цитрин А.Г., Лашин А.В., Зенин О.К., Белоусов В.В., Шляховер В.Е. / Искусственный интеллект, – 2001, – №1, – С.111-118.
2. Арустамов Д.А., Ахмедов Р.Н. Оценка эффективности баллонной дилатации в лечении рубцовых стриктур мочеочника в эксперименте // 8-й Всероссийский съезд урологов: Тез. – М., 1988. – С.162-163.
3. Боровиков В.П., Боровиков И.П. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. – М. Информационно-издательский дом "Филинъ", – 1997. – 608 с.
4. Диагностика и лечение стриктуры мочеочника при гинекологической патологии / Краснопольский В.И., Буянова С.Н., Бабурина И.П. и др. // Акушерство и гинекология. – 1990. – №2. – С.52-54.
5. Застосування балонної дилатації для лікування хворих з набутими стриктурами сечоводів / Возіанов О.Ф., Черненко В.В., Возіанов С.О., Черненко Д.В. // Урологія. – 2001. – №1. – С.25-27.2. Лопаткин Н.А., Люлько А.В. Аномалии мочеполовой системы. – Киев, 1987.
6. Мартов А.Г. Перспективы современной рентгенэндоскопической урологии: Актовая речь. – М., 1995.
7. Мартов А.Г. Рентгенэндоскопические методы диагностики и лечения почек и верхних мочевых путей: Дисс. д-ра мед.наук. – М., 1993.
8. Пурия Б.А., Касьянов В.А. Биомеханика крупных кровеносных сосудов человека. – Рига "Зинатне", - 1980. – 258с.
9. Федоров С.П. Хирургия почек и мочеочников. – М.; Пб, 1923-1926. – Вып.1.
10. Фейнман Р., Лейтон Р., Сендс М. Физика сплошных сред. - М. Мир. – 1977. – 287 с.
11. Brooks J.D., Kavoussi L.R., Preminger G.M. et al. // Urology. – 1995. – vol. 46, N 6. – P. 791-795.
12. Controversies in Endourology / Ed. A. Smith. – Philadelphia, 1995. – P.274.
13. In Vitro Identification of Angioplasty-Induced Injury by Use of Vascular Acoustic Emissions /Vonesh M.J., Mockros L.F., Davidson C.J., and other // Circulation. – Vol.95, №4. – 1997. – P.1022-1028.
14. Shlyachover V.E., Zenin O.K. Mechanical characteristics of totally ischaemic heart//Cardiovasc. Res. – 1993. – № 27. – P.807-810.

## Влияние золотых наночастиц на морфологию лимфатических узлов в эксперименте

\*О. В. Злобина, С. С. Пахомий, И. И. Дорошенко, А. Б. Бучарская

ГОУ ВПО Саратовский Государственный Медицинский Университет им. В.И. Разумовского Саратов, Россия

\*Corresponding author: E-mail: ZlobinaOW@rambler.ru

### Experimental effects of gold nanoparticles on the morphology of lymph nodes

O. V. Zlobina, S. S. Pahomii, I. I. Doroshenko, A. B. Bucharskaia

It was investigated the influence of gold nanoparticles with different size (1-3 nm, 15 nm and 50 nm) on the morphokinetics of mesenterial lymphatic node cell populations of healthy laboratory animals. It was established that the oral administration of gold nanoparticles caused the changes of morphokinetics of mesenterial lymphatic node cell populations. The morphological reorganizations in the mesenterial lymphatic nodes testified about activation of migration processes, the proliferation and differentiation processes of immunocompetent cells, which assumes the presence of immunomodulating action of gold nanoparticles.

**Key words:** gold nanoparticles, mesenterial lymphatic node, cell populations.

Было исследовано влияние золотых наночастиц различного размера (1-3 нм, 15 нм и 50 нм) на морфокинетику и популяцию клеток мезентериальных лимфатических узлов у здоровых лабораторных животных. Было установлено, что пероральное введение золотых наночастиц вызывало изменение морфокинетики и популяции клеток мезентериальных лимфатических узлов. Морфологическая перестройка в мезентериальных лимфатических узлах свидетельствует об активации миграционных, пролиферационных процессов и дифференцировки в иммунокомпетентных клетках, которые принимают на себя иммуномоделирующее действие золотых наночастиц.

**Ключевые слова:** золотые наночастицы, лимфатический узел, популяции клеток.

К настоящему моменту опубликовано большое количество работ по использованию золотых наночастиц (ЗНЧ) в различных областях нанобиотехнологии. Наряду с апробированными применениями, в последние годы ЗНЧ начинают активно использоваться в различных областях наномедицины в диагностических и

терапевтических целях [1, 2, 3]. В частности, их используют как носители для доставки лекарственных веществ, генетического материала, антигенов и как собственно лекарственное или диагностическое средство при терапии опухолей или ревматоидного артрита [4]. Два препарата для внутривенного введения – AurImmune™ и AuroLase™ – прошли уже клинические испытания [5]. Опубликован также обширный материал по клиническим испытаниям препарата Aurasol® в виде таблеток для лечения тяжелых форм ревматоидного артрита [4].

Практически синхронно с началом медицинских применений ЗНЧ возникли острые вопросы по поводу их биораспределения, циркуляции в кровяном русле, фармакокинетики и выведения из организма, а также возможной токсичности на уровне целого организма или на уровне цито- и генотоксичности. Опасения по поводу возможных последствий применения наночастиц отнюдь не беспочвенны. Например, в 1930-1950-х годах 3-10 нм частицы диоксида тория широко применялись в качестве контрастирующего агента в радиографии. Однако позже было установлено [5], что эти частицы могут накапливаться и оставаться в организме десятилетиями, вызывая нежелательные радиационные эффекты. Недавно появились публикации о токсичности ультрамалых ЗНЧ (порядка 1.5 нм) и о значительном накоплении ЗНЧ в печени и селезенке животных при очень медленной кинетике их выведения. Для золотых наностержней исходным стабилизатором являются молекулы цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ) [6], который сам по себе в свободном состоянии является известным токсичным ПАВ.

К настоящему моменту установлено, что биологические и токсические действия наноматериалов зависят от нескольких критических показателей, критическим из которых является размер и форма частиц, поверхностная функционализация, доза и способы введения и т.д. [4, 5, 7, 8]. Проведенный нами скрининг литературных данных [4, 5] показал, что резкий взрыв активности исследований в области биораспределения и токсичности ЗНЧ приходится на последние 3-4 года. Поскольку многие группы начали свои проекты независимо, наблюдается большой разброс в дизайне эксперимента, включая размер и форму частиц, способы функционализации, типы животных, дозы и способ введения частиц и т.д. Соответственно, наблюдается большой разброс данных и выводов по уровням и кинетике биораспределения и по оценкам токсичности. Поэтому, имеется настоятельная необходимость в продолжении исследований, связанных с оценками размерных эффектов наночастиц в биораспределении по органам и их воздействии на организм человека и животных, в частности на иммунную систему.

Целью данного исследования явилось комплексное изучение морфокинетики мезентериальных лимфатических узлов здоровых экспериментальных животных при пероральном введении ЗНЧ в эксперименте.

### **Материал и методы**

В эксперименте использовали ЗНЧ, синтезированные в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН (г. Саратов): частицы коллоидного золота диаметром 1-3, 15 и 50 нм.

Эксперимент проведен на 24 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 одинаковых 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». (Geneva, 1990 г.).

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

Для гистологического исследования мезентериальные лимфатические узлы фиксировали в 10% забуференном формалине. После стандартной гистологической проводки (ацетон-ксилол) материал заливали в парафин. Серийные срезы лимфатических узлов толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Подсчет клеточных элементов (малых, средних, больших лимфоцитов, плазмочитов, иммунобластов и фигур митоза) проводили в различных функциональных зонах лимфатического узла стандартным методом при увеличении x 100, x 400, x 1000, с использованием морфометрической программы Bio Vision

в 10 полях зрения на условные единицы площади (6400 мкм). Фотосъемка гистологических препаратов проводилась с помощью цифровой фотокамеры SCOPETEK DCM. Для статистической обработки полученных результатов использовалась программа “Statistica 6,0”.

## Результаты

Являясь органами иммуногенеза, лимфатические узлы содержат иммунокомпетентные клетки, находящиеся на различных этапах дифференцировки. Эти органы становятся участниками адаптационных реакций организма в ответ на воздействие самых разнообразных факторов. Нами были проведены исследования, в которых мы попытались проанализировать морфологические изменения, возникающие в лимфатических узлах.

Контрольные эксперименты показали, что распределение различных типов клеток в разных зонах лимфоузлов неоднородно. Лимфатические фолликулы кортикальной зоны не содержат светлых центров, в них преобладают малые лимфоциты, значительно меньше обнаруживается средних лимфоцитов, очень мало иммунобластов и практически отсутствуют большие лимфоциты, плазмциты и тучные клетки. В паракортикальной зоне преобладающими клеточными элементами также являются малые лимфоциты, в 5 раз меньше содержится средних лимфоцитов, редко встречаются большие лимфоциты и плазмциты и практически отсутствуют иммунобласты и тучные клетки. В мозговых тяжах преобладают малые лимфоциты, однако их абсолютное количество в 3 раза ниже, чем в лимфатических фолликулах и паракортикальной зоне. Часто встречаются средние лимфоциты и плазмциты и лишь в небольшом количестве присутствуют большие лимфоциты, иммунобласты и тучные клетки.

При морфометрическом анализе клеточных популяций различных функциональных зон мезентериальных лимфатических узлов после введения ЗНЧ размером 1-3 нм в течение 15 дней достоверных различий с группой контроля не выявлено. Количество малых лимфоцитов в лимфатических фолликулах и паракортикальной зоне составило  $62,3 \pm 1,6$ , и  $61,2 \pm 1,2$  соответственно (при контроле –  $64,2 \pm 2,1$  и  $60,1 \pm 1,2$  соответственно). Количество средних лимфоцитов в лимфатических фолликулах и паракортикальной зоне составило  $16,6 \pm 1,2$  и  $14,3 \pm 0,8$  соответственно (при контроле –  $18,2 \pm 0,4$  и  $12,1 \pm 1,1$  соответственно). Количество больших лимфоцитов в лимфатических фолликулах и паракортикальной зоне составило  $0,5 \pm 0,01$  и  $0,67 \pm 0,1$  соответственно (при контроле 0 и  $0,75 \pm 0,1$  соответственно). В зоне мозговых тяжей количество малых лимфоцитов составило –  $18,3 \pm 1,0$ ; средних лимфоцитов –  $10,4 \pm 1,0$ ; плазмцитов –  $17,9 \pm 1,2$ ; иммунобластов –  $2,0 \pm 0,3$  (при контроле –  $20,2 \pm 1,3$ ;  $10,2 \pm 1,7$ ;  $15,3 \pm 0,6$ ;  $2,3 \pm 0,3$  соответственно).

В корковом веществе лимфатических фолликулов при изучении морфокинетики клеточных элементов после введения ЗНЧ размером 15 и 50 нм были обнаружены изменения соотношения первичных и вторичных фолликулов, что косвенно свидетельствует об активизации лимфоцитопоэза. При гистологическом исследовании морфокинетики клеточных популяций в этой зоне было обнаружено увеличение количества малых (при 15 нм –  $71,2 \pm 1,2$ ; при 50 нм –  $83,3 \pm 1,7$   $p < 0,01$ ), средних лимфоцитов (при 15 нм –  $30,1 \pm 2,1$ , при 50 нм –  $35,3 \pm 1$   $p < 0,01$ ), иммунобластов (при 15 нм –  $4,8 \pm 0,3$ , при 50 нм –  $10,4 \pm 0,3$   $p < 0,01$ ) по сравнению с группой контроля (малые лимфоциты –  $64,2 \pm 2,1$ ; средние лимфоциты –  $18,2 \pm 0,4$ ; иммунобласты –  $2,5 \pm 0,3$ ).

В паракортикальной зоне мезентериальных лимфатических узлов отмечалось увеличение количества малых лимфоцитов (при 15 нм –  $66,2 \pm 1,1$ ; при 50 нм –  $72,4 \pm 1,1$ ;  $p < 0,05$ ), средних лимфоцитов (при 15 нм –  $30,1 \pm 2,1$ ; при 50 нм –  $35,3 \pm 1,0$ ), иммунобластов (при 15 нм –  $0,7 \pm 0,1$ ; при 50 нм –  $2,9 \pm 0,1$ ) по сравнению с группой контроля (малые лимфоциты –  $60,1 \pm 1,2$ ; средние лимфоциты –  $12,1 \pm 1,1$ ).

В зоне мозговых тяжей мезентериальных лимфатических узлов отмечалось увеличение количества плазмцитов (при 15 нм –  $26,4 \pm 3,4$ ; при 50 нм –  $38,4 \pm 3,4$ ,  $p < 0,01$ ) по сравнению с группой контроля ( $15,3 \pm 0,6$ ).

Во всех функциональных зонах было обнаружено увеличение количества фигур митоза, особенно в зоне лимфатических фолликулов (при 15 нм –  $4,0 \pm 0,3$ ; при 50 нм –  $4,6 \pm 0,07$ ) по сравнению с группой контроля ( $0,2 \pm 0,01$ )  $p < 0,01$ .

## Обсуждение

Сведений о влиянии ЗНЧ на пролиферативную активность лимфоцитов крайне мало. Известно, в частности, что инъекционное введение лабораторным животным коллоидного золота может приводить к его накоплению в ретикулярных клетках лимфоидной ткани, активации клеточного и гуморального

иммунитета [9, 10]. Интересным является установленный факт размерной зависимости цитотоксичности ЗНЧ – была показана выраженная цитотоксичность лишь для частиц диаметром 1,4 нм, но не для частиц диаметром 15 нм. [5].

В работах [9, 10] были исследованы свойства ЗНЧ для доставки антигенов *in vivo*, и было выявлено, что ЗНЧ увеличивают фагоцитарную активность макрофагов и вызывают функционализацию лимфоцитов, что, вероятно, обуславливает иммуномодулирующий эффект ЗНЧ [10].

Анализируя полученные результаты можно отметить, что динамические изменения выражались в увеличении количества малых лимфоцитов в лимфоидных фолликулах и паракортикальной зоне лимфоузлов. На гистологических препаратах увеличивается площадь паракортикальной зоны лимфоузлов. В эти сроки экспериментального исследования зафиксированы признаки усиления пролиферативной активности лимфоидных клеток.

Косвенным подтверждением этого является увеличение содержания клеток с фигурами митоза, которое в разной степени нашло свое отражение в герминативных центрах лимфоидных фолликулов, паракортикальной зоне и в мозговых тяжах.

В лимфатических узлах экспериментальных животных отмечаются признаки усиления процессов дифференцировки и созревания клеточных элементов. Это выражается в повышении количества иммунобластов и больших лимфоцитов в структурных зонах лимфатических узлов. Отчетливой является и динамика содержания клеток плазмочитарного ростка, наиболее заметная в мозговых тяжах.

Описанная кинетика клеточных популяций лимфоузлов вполне согласуется с литературными данными о цитологических и функциональных перестройках периферических органов иммуногенеза под влиянием различных воздействий. Динамика малых, средних, больших лимфоцитов и иммунобластов в структурных зонах лимфатических узлов служит морфологическим подтверждением активации процессов миграции, пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

Таким образом, выявленные изменения количественных соотношений клеточных компонентов лимфоузлов после введения ЗНЧ указывают на вполне определенную и отчетливую тенденцию к развитию процессов пролиферации и дифференцировки лимфоцитов, что дает основание для предположения о стимулирующем влиянии ЗНЧ размером 15 нм и особенно 50 нм на иммунокомпетентные клетки лимфатических узлов.

## Выводы

Резюмируя вышеизложенные данные можно прийти к заключению, что пероральное введение ЗНЧ размером 15 нм и 50 нм в течение 15 дней приводит к изменению морфокинетики клеточных популяций мезентериальных лимфатических узлов.

Морфологические перестройки в мезентериальных лимфатических узлах свидетельствуют об активации процессов миграции, пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, что предполагает наличие иммуномодулирующего действия ЗНЧ.

## Литература

1. Jain KK: A Handbook of Nanomedicine. Totowa, NJ: Humana/Springer; 2008.
2. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Rev.* 2009;38:1759-1782.
3. Дыкман ЛА, Богатырев ВА, Щеголев СЮ, и др. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008.
4. Khlebtsov NG, Dykman LA. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Chem. Soc. Rev.* 2011. DOI: 10.1039/c0cs00018c.
5. Хлебцов НГ, Дыкман ЛА. Биораспределение и токсичность золотых наночастиц. *Российские нанотехнологии.* 2011;6(1-2):001-021.
6. Khlebtsov NG, Dykman LA. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J. Quant. Spectr. Radiat. Transfer.* 2010;111:1-35.
7. Yen H.-J., Hsu S.-h., Tsai Ch.-L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes // *Small.* - 2009. - V. 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. - V. 12. - P. 2313-2333.
9. Staroverov S.A., Aksinenko N.M., Gabalov K.P., Vasilenko O.A., Vidyasheva I.V., Shchyogolev S.Yu., Dykman L.A. Effect of gold nanoparticles on the respiratory activity of peritoneal macrophages S.A. Staroverov // *Gold Bulletin.* 2009.- V. 42, No 2. - P. 153-156.
10. Dykman LA, Staroverov SA, Bogatyrev VA, et al. Gold Nanoparticles as an Antigen Carrier and an Adjuvant. New York: Nova Publ., 2010;54.