

НАНОТЕХНОЛОГИИ

ВЛИЯНИЕ НАНОДИСПЕРСНЫХ ФОРМ ЖЕЛЕЗА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ СИСТЕМЫ КРОВИ

М.Ю.Скоркина, А.И.Везенцев, М.З.Федорова, В.В.Симонов, И.Л.Канев

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

Изучено влияние нанодисперсных форм железа на морфофункциональные параметры системы крови. Установлено, что введение маггемита и лепидокрокита вызывает сдвиг лейкоцитарной формулы в сторону сегментоядерных форм нейтрофилов, снижение жесткости лимфоцитов и увеличение их компактизации. Кроме того, в кровотоке увеличивается количество мелких гиперхромных форм эритроцитов с повышенной жесткостью. Доказано, что однократное введение нанодисперсных железосодержащих препаратов стимулирует дыхательную функцию крови и улучшает ее микрореологические свойства.

Ключевые слова: *нанодисперсные формы железа, эритроциты, лимфоциты, полуконтактная атомно-силовая микроскопия*

Биологические и токсические свойства объектов нанометрового размера зависят от степени их дисперсности, физико-химических свойств и структурных особенностей [5]. В литературе представлены экспериментальные работы по изучению взаимодействия наночастиц различного химического состава и структуры с биологическими объектами [7]. Показано, что металлооксидные наночастицы обладают цитотоксическими, эмбриотоксическими и тератогенными свойствами [6], способностью накапливаться в лимфоидной ткани и вызывать повреждение ДНК [1], нарушать работу системы свертывания крови [3]. Однако токсичность наноматериалов зависит не только от физической природы, способа получения, размеров, структуры наночастиц, но и от биологической модели, на которой проводятся испытания. Причем исследователи указывают, что не всегда наноматериалы оказывают токсическое или иное повреждающее действие [4], в связи с чем ведется активная разработка тестов для оценки токсичности наноматериалов.

Целью данной работы являлась оценка влияния нанодисперсных форм железа на морфофункциональные параметры эритроцитов и лейкоцитов.

Адрес для корреспонденции: skorkina@bsu.edu.ru. Скоркина М.Ю.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования выполнены на базе лаборатории физиологии адаптационных процессов Белгородского государственного национального исследовательского университета (НИУ "БелГУ"). Использованы железосодержащие нанодисперсные препараты — маггемит ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) и лепидокрокит ($\gamma\text{-FeOOH}$), а также раствор, содержащий ионы железа. Нанодисперсная форма маггемита представляет собой нанотрубки длиной 100 нм, диаметром 10 нм, с шириной канала внутри трубок 2-3 нм. Наночастицы лепидокрокита — наностержни цилиндрической формы длиной 100-150 нм и диаметром порядка 5-8 нм. Раствор, содержащий ионы железа, был приготовлен из соли Мора $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ марки "хч". Концентрация ионов железа в исследуемом растворе составляла 0.25 ммоль/л.

Оценку биологической активности железосодержащих препаратов проводили на половозрелых самцах беспородных лабораторных крыс ($n=24$). Исследования выполнены с соблюдением всех требований Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными и директивами Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Животных содержали на стандартном

рационе; питание, температура и влажность для всех животных были одинаковыми. Первая группа ($n=6$) являлась контрольной, крысам 2, 3 и 4-й групп (по 6 особей в каждой) однократно интрагастрально через желудочный зонд вводили суспензию наночастиц $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\gamma\text{-FeOOH}$ и раствора соли Мора соответственно. Объем вводимой суспензии составлял 1 мл при концентрации наночастиц маггемита и лепидокрокита 100 мг/мл и концентрации ионов железа в растворе 0.25 ммоль/л. Перед введением суспензии обрабатывали в ультразвуковой ванне Сапфир УЗВ-1.3 ТТЦ в течение 10 мин для разрушения агломератов наночастиц. Контрольной группе животных вводили 1 мл воды.

Кровь брали путем декапитации наркотизированных животных через 24 ч после введения исследуемых веществ. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20 ЕД/мл). Для подсчета лейкоцитарной формулы из цельной крови готовили мазки, которые окрашивали по Романовскому—Гимзе. Популяции эритроцитов и лейкоцитов выделяли путем центрифугирования крови в течение 10 мин при 1500 об/мин. Собирали лейкоцитарное кольцо. Эритроциты отмывали и ресуспендировали в изотоническом буферном растворе. У животных всех групп подсчитывали число эритроцитов в камере Горяева, определяли фотокolorиметрически концентрацию гемоглобина, измеряли показатель гематокрита после центрифугирования цельной крови на гематокритной центрифуге. Из полученной лейкоцитарной и эритроцитарной суспензий делали мазки для атомно-силовой микроскопии. Сканирование проводили во влажной камере в полуконтактном режиме с использованием кремниевых зондов серии NSG03 (NT-MDT), жесткостью 1.1 Н/м с радиусом закругления 10 нм, частотой развертки сканирования порядка 0.6-0.8 Гц. На полученных сканах измеряли диаметр, высоту и объем клеток. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения "Nova 1.0.26 Build 1397" (компания "НТ-МДТ"). Влияние нанодисперсных железосодержащих препаратов на упруго-эластические свойства форменных элементов крови изучали в режиме атомно-силовой спектроскопии при наложении нагрузки на локальные участки клеточной поверхности.

Содержание железа в плазме крови крыс контрольной и двух опытных групп (маггемит и растворимое железо) определяли методом рентгеновского спектрохимического анализа. Исследования проводили на рентгенофлуоресцентном спектрометре "ARL Optim X" Центра коллективного пользования оборудованием НИУ "БелГУ". Полученные экспериментальные данные статистически

обрабатывали, достоверность различий определяли с использованием t критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате однократного перорального введения железосодержащих препаратов установлено увеличение по сравнению с контролем концентрации атомов железа в плазме крови на 86% ($p<0.05$) в группе животных, получавших соль Мора, и на 43% ($p<0.05$) у крыс, получавших маггемит.

В лейкоцитарной формуле опытных животных выявлен сдвиг в сторону зрелых сегментоядерных нейтрофилов на фоне снижения количества эозинофилов. В группе животных, получавших маггемит и лепидокрокит, число сегментоядерных нейтрофилов увеличивалось на 40 и 23.5% ($p<0.05$) соответственно, а количество юных нейтрофилов снижалось на 36 и 40% ($p<0.05$) по сравнению с контролем (таблица). Нанодисперсные железосодержащие препараты не оказывали существенного влияния на общее количество лейкоцитов. Под влиянием нанодисперсных форм железа изменялись морфометрические параметры лимфоцитов. Увеличение высоты лимфоцитов на 10% ($p<0.05$) и снижение площади поверхности на 14% ($p<0.05$) по сравнению с контролем установлены в группе лепидокрокита. В группе крыс, получавших растворимое железо на основе соли Мора, диаметр лимфоцитов и площадь поверхности уменьшались на 13 и 28% ($p<0.05$) соответственно, а высота клетки увеличивалась на 11% ($p<0.05$) по сравнению с контролем. Жесткость лимфоцитов под влиянием как наночастиц железа, так и растворимого железа снижалась на 14.18% и 18.18% ($p<0.05$) соответственно по сравнению с контролем.

В группах крыс, получавших как маггемит, так и лепидокрокит, общее количество эритроцитов снижалось на 10 и 19% ($p<0.05$) соответственно, при этом резко возрастала концентрация гемоглобина на 58.4 и 62% ($p<0.05$) по сравнению с контролем. Под влиянием маггемита высота, объем и площадь поверхности эритроцитов уменьшались на 12, 23 и 23% ($p<0.05$) соответственно по сравнению с контролем (таблица). Выраженного влияния лепидокрокита на морфометрические параметры эритроцитов не установлено. В целом реакция эритроидного звена системы крови под влиянием наночастиц железа, направленная на снижение размеров клеток, протекала на фоне изменений функциональных характеристик эритроцитов. Это выражалось в увеличении концентрации гемоглобина в эритроците до 33.5 ± 0.9 пг в группе животных, получавших маггемит, а также до 37.5 ± 2.5 пг у крыс, получавших лепидокрокит,

Морфофункциональные показатели системы крови

Параметр	Контроль	Маггемит	Лепидокрокит
Количество лейкоцитов, 10^9 л^{-1}	3.6±0.6	3.00±0.35	2.80±0.15
Моноциты, %	1.8±0.6	1.7±0.3	—
Эозинофилы, %	1.3±0.2	0.70±0.08*	—
Юные нейтрофилы, %	2.5±0.3	0.90±0.01*	1.000±0.001*
Палочкоядерные нейтрофилы, %	16.9±0.6	16.3±0.2	13.80±0.08*
Сегментоядерные нейтрофилы, %	17.4±0.3	24.4±1.5*	21.5±1.0*
Диаметр лимфоцитов, мкм	7.50±0.08	7.30±0.08	6.90±0.07
Высота лимфоцитов, мкм	1.40±0.04	1.40±0.01	1.60±0.02*
Площадь поверхности лимфоцитов, мкм^2	44.40±0.98	41.90±0.04	38.20±0.81*
Объем лимфоцитов, мкм^3	60.5±1.5	55.6±0.7	58.7±1.2
Жесткость лимфоцитов, Па	16.9±0.7	14.8±0.6*	14.3±0.5*
Количество эритроцитов, 10^{12} л^{-1}	7.50±0.24	6.800±0.005*	6.30±0.11*
Концентрация гемоглобина, г/л	145.3±3.7	230.1±8.0*	235.2±2.6*
Гематокрит, %	36.00±0.01	37.00±0.01	35.00±0.01
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, пг	20.1±3.6	33.54±0.90*	37.5±2.5*
Диаметр эритроцита, мкм	5.80±0.07	5.70±0.04	5.60±0.06
Высота эритроцита, мкм	0.50±0.01	0.40±0.01*	0.50±0.01
Объем эритроцита, мкм^3	30.5±1.4	23.5±1.1*	30.6±1.5
Площадь поверхности эритроцита, мкм^2	52.2±8.7	40.3±6.5*	52.2±2.7
Жесткость эритроцитов, Па	17.6±2.5	22.5±1.2*	19.9±1.0*

Примечание. * $p < 0.05$ сравнению с контролем.

что повлекло за собой возрастание кислородной емкости крови на 58.4 и 50% ($p < 0.05$) соответственно по сравнению с контролем. При этом диаметр эритроцитов и показатель гематокрита практически не отличались у животных опытных и контрольной групп. Упругость эритроцитов под влиянием наночастиц железа возрастала по сравнению с контролем на 28% ($p < 0.05$) в группе животных, получавших маггемит, и на 13% ($p < 0.05$) в группе лепидокрокита.

Таким образом, однократное введение нанодисперсных железосодержащих препаратов усиливает фагоцитарную активность системы крови, увеличивая количество зрелых сегментоядерных форм и снижая процент юных нейтрофилов, не исключено, что за счет ускорения времени их созревания. Кроме того, снижение жесткости лимфоцитов под влиянием как наночастиц, так и растворимых форм железа улучшает реологические свойства крови. На основании данных патоморфологических исследований, установлено, что введение наножелеза в пределах дозы 250 мг/кг массы тела не оказывает токсического воздействия на органы и ткани, вместе с тем при введении препарата происходит активизация иммунологических реакций [2].

Нанодисперсные формы железа стимулируют дыхательную функцию крови, изменяя геометрический профиль эритроцитов и насыщенность их гемоглобином. Возможно, появление в кровотоке гиперхромных форм эритроцитов небольших размеров связано с включением перераспределительных реакций в системе, направленных на поддержание кислородного гомеостаза. В частности, геометрический профиль и содержание гемоглобина в каждом эритроците играют ключевую роль в процессах оксигенации: чем мельче эритроцит, тем выше скорость поглощения кислорода гемоглобином в легких. Гиперхромия эритроцитов крыс опытной группы поддерживает кислородно-транспортную функцию крови при пониженном количестве эритроцитов, что улучшает ее реологические свойства. Вместе с тем выявленное увеличение жесткости эритроцитов в опытных группах крыс свидетельствует о сорбции и транспорте нанодисперсных форм железа на поверхности эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеглов С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М., 2008.

2. *Карбасов Ю.С.* Новые материалы. М., 2002. С. 262-273.
3. *Коваленко Л.В., Фолманис Г.Э.* Биологически активные нанопорошки железа. М., 2006.
4. *Шляhto Е.В.* Нанотехнологии в биологии и медицине. Современное состояние вопроса. М., 2005.
5. *Gao J., Xu B.* // Nano Today. Vol. 4. P. 37-51.
6. *Hanawa T., Kaga M., Itoh Y. et al.* // Biomaterials. 1992. Vol. 13, N 1. P. 20-24.
7. *Nel A., Xia T., Maedler L., Li N.* // Science. 2006. Vol. 311. P. 622-627.

Получено 10.04.12
