



## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ МАГГЕМИТА ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) И ЛЕПИДОКРОКИТА ( $\gamma\text{-FeOOH}$ ) НА КЛЕТКИ КРОВИ КРЫС ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ИНТРАГАСТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ

**В.В. Симонов**  
**И.Л. Канев**  
**М.З. Федорова**  
**А.И. Везенцев**  
**С.В. Надеждин**  
**Е.В. Симон**

*Белгородский  
государственный  
университет,  
Россия, 308015, г. Белгород,  
ул. Победы, 85*

*E-mail: fedorova@bsu.edu.ru*

Оценены морфологические и функциональные показатели клеток крови крыс после однократного интрагастрального введения суспензии наночастиц маггемита и лепидокрокита. Показаны изменения упругости и проницаемости плазмалеммы лейкоцитов крови животных опытных групп.

Ключевые слова: наночастицы, маггемит, лепидокрокит, эритроциты, лимфоциты, морфометрические параметры, проницаемость плазмалеммы.

### Введение

В последние годы отмечается быстрый рост научного, промышленного и коммерческого интереса к наноматериалам. Они производятся в различных формах: нанопорошки, нановолокна, нанотрубки и т.д. [2]. Свойства наночастиц уникальны - высокая поверхностная энергия, устойчивая сорбция биомолекул, изменение физико-химических свойств наночастиц под действием физических полей, наличие магнитных свойств [5]. Благодаря своим размерам (менее 100 нм), сопоставимым с размерами клеток (10–100 мкм), вирусов (20–450 нм), белков (5–50 нм), ДНК (2 нм шириной, 10–100 нм длиной), наночастицы могут приближаться к биообъекту, взаимодействовать и связываться с ним [10]. Наночастицы, обладающие магнитными свойствами, представляют значительный интерес для медицины, что связано с возможностью дистантного управления ими и конструкциями на их основе при наложении внешнего магнитного поля [8]. В настоящее время наиболее широкое применение в биомедицине получили частицы наноразмерного оксида железа [6,9]. Магнитные наночастицы используются в новых методах диагностики, адресного терапевтического воздействия и разработки биологических тканей [4]. Это открывает широкие перспективы для использования наноразмерных оксидов железа в медицине, но также влечет за собой серьезные риски для здоровья человека. Очень слабая растворимость наночастиц в биологических жидкостях является основной причиной биорисков. Из-за крошечного размера, некоторые из них могут проходить через различные биологические барьеры, и транспортироваться по организму в нерастворимой форме. Таким образом, наночастицы могут оказаться в кровотоке после прохождения через дыхательную систему или желудочно-кишечный тракт [7]. Оказавшись в кровяном русле, наночастицы агрегируют к наружной поверхности эритроцитов, искажая саму поверхность мембраны [1]. Исследование различных аспектов влияния наноматериалов на живой организм является актуальной проблемой сегодняшнего дня [3].

Целью данной работы явилась оценка влияния наночастиц  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  и  $\gamma\text{-FeOOH}$  на клетки крови крыс после однократного интрагастрального введения.

### Материалы и методы

Лепидокрокит ( $\gamma\text{-FeOOH}$ ) в нанодисперсной форме был синтезирован осаждением щелочью из раствора соли двухвалентного железа. Наночастицы маггемита ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) получены путем пиролиза порошка лепидокрокита.

Частицы  $\gamma\text{-FeOOH}$  представляют собой наностержни цилиндрической формы, имеющие длину 100-150 нм и диаметр порядка 5–8 нм. Они объединены в параллельноволокнистые агрегаты (рис 1).



Рис. 1. Нанотубулярные частицы  $\gamma\text{-FeOOH}$  (а) и  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (б)

Микрофотографии получены с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-2100 в Центре коллективного пользования БелГУ

Нанодисперсный  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  представляет собой трубки с длиной, сравнимой с длиной стержней  $\gamma\text{-FeOOH}$  (100 нм), но имеющие больший диаметр – 10 нм. Ширина канала внутри трубок 2–3 нм (рис. 1).

Для проверки биологического действия наночастиц маггемита и липидокрокита и оценки их возможного влияния на эритроциты и лейкоциты были проведены эксперименты на самцах лабораторных белых крыс. Животные были разделены на три группы. Первая группа являлась контрольной, крысам второй и третьей групп однократно интрагастрально вводили суспензию наночастиц  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  и  $\gamma\text{-FeOOH}$ . Объем вводимой суспензии составлял 1 мл, при концентрации наночастиц маггемита и липидокрокита 100мг/мл. Перед введением суспензию обрабатывали в ультразвуковой ванне Сапфир УЗВ – 1,3 ТТЦ (Россия) в течение 10 минут, чтобы разрушить агрегаты наночастиц. Забор крови осуществляли путем декапитации, наркотизированных животных через 24 часа после введения суспензии.

В цельной крови подсчитывали количество эритроцитов и лейкоцитов по стандартным методикам. Для получения концентрированной суспензии лейкоцитов кровь центрифугировали 10 мин. при 1500 об./мин., затем собирали лейкоцитарное кольцо. Примесь эритроцитов разрушали 0.83% раствором хлорида аммония. Из цельной крови и полученной лейкоцитарной суспензии делали мазки для атомно-силового микроскопа (АСМ) NTEGRA vita (NT-MDT Зеленоград, Россия). Сканирование проводили во влажной камере в полуконтактном режиме с использованием кантилевера NSG 11. Морфометрические параметры и упругость плазмалеммы эритроцитов и лимфоцитов оценивали с помощью программного обеспечения Nova 1.0.26 build 1508 (NT-MDT Зеленоград, Россия).

Для оценки проницаемости клеточных мембран лейкоцитов использовали методику флуоресцентного зонда – ацетооксиметилового эфира кальцеина. После 30-минутной инкубации в одной из сред лимфоциты помещали в ячейки (Secure-Seal spacer, Cat. – S24737, Molecular Probes, Inc. USA) с питательной средой RPMI (НПП «ПанЭко», Москва) и добавляли 0,5  $\mu\text{l}$  1mM кальцеина (Calcein AM, Cat. C3100MP, Molecular Probes, Inc. USA). Сканирование образцов проводили на КЛСМ Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus с использованием лазера 488 нм в течение 1200 секунд и программного обеспечения EZ-C1 ver. 3.80. Осуществляли регистрацию интенсивности флуоресцентного излучения кальцеина в заданный промежуток времени с последующим расчетом коэффициента проникновения -  $K_n$  (y.e.) по следующей формуле:  $K_n = \text{Int}_{\text{max}}/t$ , где  $\text{Int}_{\text{max}}$  – значение максимальной интенсивности (y.e.);  $t$  – время максимального пика интенсивности излучения флуоресцентного зонда (с).



Полученные данные обработаны с помощью программного комплекса Statistica 6. Достоверность различий между группами оценивали по t-критерию Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Общее количество эритроцитов в крови крыс опытных групп уменьшилось: у контрольных животных это показатель составил  $7.5 \pm 0,2 \cdot 10^{12}/\text{л}$ , в опытных группах получавших  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  и  $\gamma\text{-FeOOH}$  –  $6,8 \pm 0,1 \cdot 10^{12}/\text{л}$ , и  $6,3 \pm 0,1 \cdot 10^{12}/\text{л}$  соответственно. Статистически значимы изменения и морфометрических параметров эритроцитов крови крыс опытных групп: высота и объем клеток в группе животных получавших  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , достоверно снижались по сравнению с контролем, на 11% и 23,3 % (табл. 1).

Таблица 1

**Морфометрические параметры и упругость клеточной мембраны эритроцитов**

Варианты	Диаметр (мкм)	Высота (мкм)	Площадь (мкм <sup>2</sup> )	Объем (мкм <sup>3</sup> )	Упругость плазмалеммы (Па (Па))
Контроль	$5.80 \pm 0.07$	$0.47 \pm 0.01$	$28.26 \pm 0.53$	$30.55 \pm 1.41$	$16.20 \pm 0.49$
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	$5.67 \pm 0.04$	$0.42 \pm 0.01^*$	$28.88 \pm 0.48$	$23.46 \pm 1.09^*$	$22.42 \pm 0.95^*$
$\gamma\text{-FeOOH}$	$5.61 \pm 0.07^*$	$0.46 \pm 0.01^\wedge$	$25.71 \pm 0.41^*$	$30.58 \pm 1.49^\wedge$	$18.54 \pm 0.89^*$

\* - достоверность различий между контрольной и опытными группами по критерию Стьюдента ( $p < 0.05$ ).

^\wedge - достоверность различий между опытными группами по критерию Стьюдента ( $p < 0.01$ ).

Площадь поверхности, а следовательно и кислородная ёмкость эритроцитов крыс, которым вводили  $\gamma\text{-FeOOH}$ , сократилась на 9.1 % по сравнению с контрольной группой.  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  не вызывал таких изменений морфофункциональных параметров эритроцитов. У животных, получавших суспензию наночастиц лепидокрокита и маггемита, достоверно возрастала упругость клеточной мембраны эритроцитов (табл. 1).

Общее количество лейкоцитов в крови животных, получавших суспензию наночастиц лепидокрокита, достоверно снижалось по сравнению с контрольной группой и составляло  $2.8 \pm 0,2 \cdot 10^9/\text{л}$  – в опыте и  $3.6 \pm 10 \cdot 10^9/\text{л}$  – в контроле. Достоверных изменений этого параметра у крыс, получавших суспензию нанодисперсного маггемита, не выявлено, но была отмечена тенденция к снижению общего количества лейкоцитов в крови животных данной группы ( $3 \pm 0.4 \cdot 10^9/\text{л}$ ).

Объем лимфоцитов в опытах с наночастицами  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  достоверно уменьшился, разница с контролем составляла 8%, статистически значимых различий по высоте, диаметру и площади не зарегистрировано, но выявлена тенденция к уменьшению всех перечисленных морфометрических параметров клеток (табл. 2).

Таблица 2

**Морфометрические параметры и упругость клеточной мембраны лимфоцитов, полученные с помощью АСМ**

Варианты	Диаметр (мкм)	Высота (мкм)	Площадь (мкм <sup>2</sup> )	Объем (мкм <sup>3</sup> )	Упругость плазмалеммы (Па)
Контроль	$7.47 \pm 0.1$	$1.41 \pm 0.04$	$44.36 \pm 1$	$60.49 \pm 1.5$	$16.88 \pm 0.7$
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	$7.26 \pm 0.1$	$1.36 \pm 0.03$	$41.88 \pm 0.9$	$55.65 \pm 1.1^*$	$14.82 \pm 0.6^*$
$\gamma\text{-FeOOH}$	$6.93 \pm 0.07^\wedge$	$1.56 \pm 0.02^{*\wedge}$	$38.20 \pm 0.8^{*\wedge}$	$58.77 \pm 1.2$	$14.25 \pm 0.50^{*\wedge}$

\* - достоверность различий между контрольной и опытными группами по критерию Стьюдента ( $p < 0.05$ ).

^\wedge - достоверность различий между опытными группами по критерию Стьюдента ( $p < 0.01$ ).

Проницаемость клеточной мембраны лейкоцитов животных, получавших суспензию маггемита, достоверно снизилась по сравнению с контролем. Время максимального пика интенсивности излучения флуоресцентного зонда составило  $1186.9 \pm 44.5$  с, что на 31% больше, чем в контроле, а значение максимальной интенсивности сократилось на 18% ( $1785.2 \pm 44.5$  у.е.) (табл. 3). Упругость плазмалеммы лейкоцитов в группе крыс, которым вводили  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  уменьшилась на 13% по сравнению с

контролем. «Съезживание» лимфоцитов, изменение пропускной способности и упругости их клеточной мембраны может свидетельствовать о прямом воздействии наночастиц  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  на клетки крови, циркулирующие в кровеносной системе.

Таблица 3

**Проницаемость клеточных мембран лейкоцитов, по данным конфокальной микроскопии**

Варианты	Значение максимальной интенсивности (у.е.)	Время максимального пика интенсивности излучения флуоресцентного зонда (с)	Коэффициент проникновения (у.е./с.)
Контроль	2110.1±75.4	903.7±20.5	2.4±0.1
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	1785.2±44.5*	1186.9±38.9*	1.6±0.1*
$\gamma\text{-FeOOH}$	2116.5±30.2^	831.1±17.8*^	2.6±0.1^

\* - достоверность различий между контрольной и опытными группами по критерию Стьюдента ( $p < 0.05$ ).

^ - достоверность различий между опытными группами по критерию Стьюдента ( $p < 0.01$ ).

В группе животных получавших лепидокрокит высота лимфоцитов возросла при уменьшении их площади, различия достоверны в сравнении с контролем (рис. 2, 3).

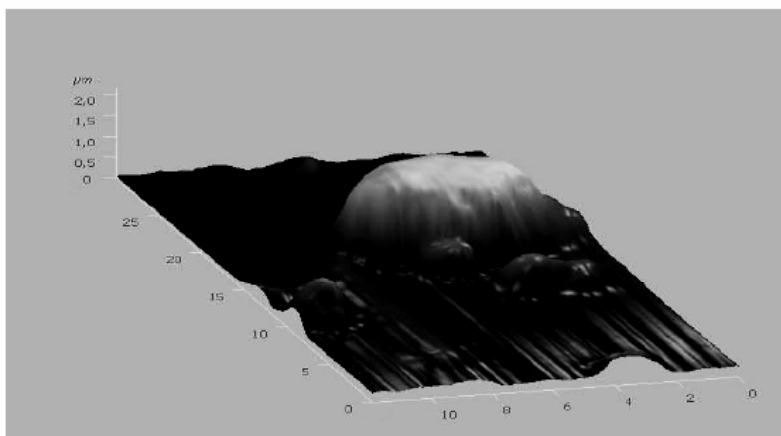


Рис.2. Скан АСМ лимфоцита крысы, получавшей лепидокрокит

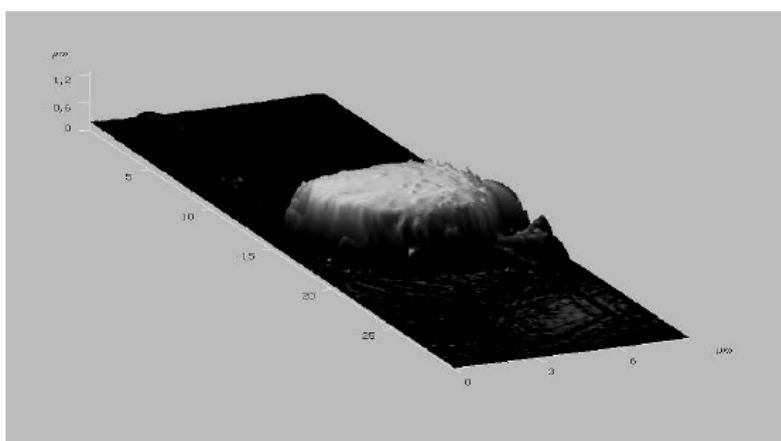


Рис.3. Скан АСМ лимфоцита крысы контрольной группы

Изменения в проницаемости клеточной мембраны лимфоцитов выражены слабее, чем у животных в опытах с  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , но время максимального пика интенсивности излучения флуоресцентного зонда меньше, чем в контрольной группе (831.1±17.8), что говорит о повышении проницаемости мембраны. Упругость плазмалеммы лимфоцитов крыс, которым вводилась суспензия  $\gamma\text{-FeOOH}$  была ниже на 13%.



### Заключение

Однократное интрагастральное введение суспензий нанодисперсного лепидокрокита и маггемита в концентрации 100 мг/мл вызывает уменьшение количества эритроцитов и лейкоцитов в крови опытных животных. Изменение морфометрических параметров, упругости и проницаемости плазмалеммы клеток служит доказательством проникновения в кровь из желудочно-кишечного тракта наностержней оксидов железа и их контакта с поверхностью клеток.

### Список литературы

1. Ингель Ф.И., Стехин А.А., Яковлева Г.В., Кочеткова М.Г. Влияние наночастиц на каталитическую активность эритроцитов крови. // Электронная публикация <http://pornano.ru/science/index.php?task=view&id=236>. – 2010. – С. 1-3.
2. Мильто И.В., Михайлов Г.А., Ратькин А.В., Магаева А.А. Влияние наноразмерных частиц на морфологию внутренних органов мыши при внутривенном введении раствора нанопорошка Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – Вып. 1 – С. 32-36.
3. Мильто И.В., Михайлов Г.А. Морфологический контроль состояния внутренних органов крысы при внутрибрюшинном введении нанопорошка Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. // Материалы Всероссийской 66-ой итоговой студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова. – Томск: СибГМУ, 2007. – С. 336
4. Першина А.Г., Сазонов А.Э., Мильто И.В. Использование магнитных наночастиц в биомедицине // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – Вып. 2 – С. 72
5. Суздаев И.П. Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов. – М.: КомКнига, 2006. – 592 с.
6. Berry C., Curtis A. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine // J. Phys. D. Appl. Phys. – 2003. - Vol. 36. – P. 198-206.
7. Claude Ostiguy, Brigitte Soucy. et al Studies and Research Projects , report R-589, Health Effects of Nanoparticles, second edition. – Montreal, 2008. - 106 p.
8. Gu H., Xu K., Xu C. et al. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection // J. of the American Chemical Society Chem. Commun. – 2006. – Vol. 9. – P. 941–949.
9. Lu A.-H., Salabas E.L., Schuth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application // Angew. Chem. Int. Ed. – 2007. – Vol. 46. – P. 1222–1244.
10. Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. Электронная публикация <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>

### ESTIMATION OF INFLUENCE OF NANOPARTICLES OF MAGHEMITE ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) AND LEPIDOCROCITE ( $\gamma\text{-FeOOH}$ ) ON BLOOD CELLS OF RATS AFTER SINGLE INTRAGASTRIAL INSTILLATION

**V.V. Simonov**  
**I.L. Kanev**  
**M.Z. Fedorova**  
**A.I. Vezentsev**  
**S.V. Nadezhdin**  
**E.V. Simon**

Belgorod State University,  
 Pobedy Str., 85, Belgorod,  
 308015, Russia

E-mail: fedorova@bsu.edu.ru

Morfometrical indicators of blood cells of rats after single intragastrical instillation of suspension of nanoparticles  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  and  $\gamma\text{-FeOOH}$  are estimated. Elasticity and permeability changes of plasmolemma of leukocytes of blood of animals in experimental groups are shown.

Key words: nanoparticles, maghemite, lepidocrocite, red blood cells, lymphocytes, morfometrical parametres, permeability of plasmolemma.