

# ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

---

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

*О. В. Злобина, И. О. Бугаева,  
С. С. Пахомий, А. Б. Бучарская, Г. Н. Маслякова*

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕЗЕНТЕРИАЛЬНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Аннотация.* Изучено морфофункциональное состояние мезентериальных лимфатических узлов белых беспородных крыс при воздействии золотых наночастиц в эксперименте. При пероральном введении золотых наночастиц диаметром 1–3, 15 и 50 нм морфометрический анализ клеточных популяций в структурно-функциональных зонах лимфатических узлов показал количественные изменения в соотношении популяций лимфоцитов различной степени зрелости. Выявленные изменения предполагают активизацию процессов миграции, пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток при воздействии золотых наночастиц.

*Ключевые слова:* золотые наночастицы, мезентериальные лимфатические узлы, клеточные популяции.

*Abstract.* The authors have studied the morphofunctional state of the mesenteric lymph nodes of white rats under the influence of gold nanoparticles in the experiment. After oral introduction of gold nanoparticles with a diameter of 1–3, 15 and 50 nm the morphometric analysis of cell populations in the structural-functional areas of lymph nodes showed quantitative changes in the ratio of lymphocyte populations with different degrees of maturity. The revealed changes presuppose activation of the migration, proliferation and differentiation of immune cells under the influence of gold nanoparticles.

*Key words:* gold nanoparticles, mesenteric lymphatic nodes, cell populations.

В настоящее время опубликовано большое количество работ, связанных с использованием золотых наночастиц (ЗНЧ) в различных областях нанобиотехнологии. В последние годы ЗНЧ стали активно применяться в различных областях наномедицины в диагностических и терапевтических целях [1–3]. Однако практически одновременно с началом медицинских применений ЗНЧ возникли вопросы об их возможной токсичности как на уровне целого организма, так и на уровне цито- и генотоксичности. Сегодня установлено, что биологические и токсические свойства наночастиц зависят от нескольких показателей, главными из которых являются размер и форма частиц, поверхностная функционализация, доза и способы введения и т.д. [4–7].

Целью настоящего исследования явилось комплексное изучение морфофункционального состояния мезентериальных лимфатических узлов здо-

ровых лабораторных животных при пероральном введении ЗНЧ разного размера в эксперименте.

### **Материалы и методы исследования**

В эксперименте были использованы ЗНЧ, синтезированные в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН (г. Саратов): частицы коллоидного золота диаметром 1–3, 15 и 50 нм (концентрация 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 ( $\text{HAuCl}_4$ , Sigma-Aldrich, USA) цитратом натрия. Наиболее мелкие частицы (1–3 нм) получали по специальным методикам, описанным в работе [1].

Для увеличения биодоступности и биосовместимости наночастицы были конъюгированы с полиэтиленгликолем. Использовался тиолированный полиэтиленгликоль PEG-SH (Nektar, USA), а также незамещенный ПЕГ-5000 (Sigma-Aldrich, USA). Протокол конъюгирования состоял в следующем.

К 50 мл суспензии наночастиц (наносфер или нанооболочек) добавляли 45 мкл 0,2 М  $\text{K}_2\text{CO}_3$  и 500 мкл 5 мМ монометокси (полиэтиленгликоль)-тиол (или ПЕГ-5000 для случая частиц диаметром 1–3 нм). Время реакции составляет примерно 10 ч. Полученные конъюгаты отмывали от избытка продуктов реакции двукратным центрифугированием и ресуспендированием в 0,9 %-м растворе хлорида натрия.

Эксперимент проведен на 24 белых беспородных крысах мужского пола массой 180–220 г. Эксперименты на животных проводились в соответствии с Женевской конвенцией «International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990). Опыты проводились в отдельной лаборатории, где были исключены посторонние раздражители, поддерживалась постоянная температура со стандартным уровнем освещения. Все животные во время эксперимента содержались в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе.

Во время исследования животные были разделены на четыре группы, в каждой группе – по шесть особей. Первая группа – контрольная; вторая, третья и четвертая – опытные. Животным контрольной группы в течение восьми дней вводили перорально через день по 1 мл физиологического раствора. Крысам опытных групп ЗНЧ вводили перорально через день из расчета 190 мкг/кг массы животного в течение восьми дней по следующей схеме: первая опытная группа – диаметр ЗНЧ 1–3 нм; вторая опытная группа – диаметр ЗНЧ 15 нм; третья опытная группа – диаметр ЗНЧ 50 нм. Забор материала осуществляли через 24 ч после последнего введения.

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

Морфометрический анализ гистологических препаратов проводили в различных функциональных зонах лимфатического узла с помощью компьютерного комплекса для контроля размеров микро- и нанометровых структур

Image Analyzer (с присвоенным расширением .iad). Фотосъемка гистологических препаратов проводилась с помощью цифровой фотокамеры SCOPETEK DCM 500 при увеличении  $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$  в 10 полях зрения на площади  $6400 \text{ мкм}^2$ .

Подсчет клеточных элементов (плазмочитов, тучных клеток, иммунобластов макрофагов) проводили в различных функциональных зонах изучаемых органов стандартным методом при увеличении  $\times 200$ ,  $\times 400$ ,  $\times 900$ ,  $\times 1350$  с использованием специализированной морфометрической сетки [8] в 10 полях зрения на площади  $6400 \text{ мкм}^2$  в трех серийных срезах.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Microsoft Excel пакета Microsoft Office 2007, а также программы «Статистика 6,0». Проверка гипотезы о нормальности распределения позволила подтвердить нормальный характер распределения изучаемых показателей, что в свою очередь позволило определить средние арифметические ( $M$ ) и ошибки средней арифметической ( $m$ ), среднее квадратическое отклонение ( $\sigma$ ). Степень достоверности различий показателей в исследуемых группах животных оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента.

### Результаты

При исследовании гистологических препаратов мезентериальных лимфатических узлов животных первой опытной группы, которой вводились ЗНЧ  $1\text{--}3 \text{ нм}$  в диаметре, достоверных различий в распределении клеточных популяций во всех исследуемых зонах по сравнению с группой контроля не было обнаружено. Количество фигур митоза также находится на уровне группы контроля.

Во второй опытной группе животных при морфометрическом анализе клеточных популяций было обнаружено увеличение абсолютного количества малых лимфоцитов в составе лимфатических фолликулов ( $77,2 \pm 1,6$ ), в группе контроля –  $64,2 \pm 2,1$  ( $p < 0,05$ ); средних лимфоцитов –  $33,1 \pm 1,1$ , по сравнению с  $18,2 \pm 0,4$  ( $p < 0,01$ ) в контрольной группе. Также отмечалось появление больших лимфоцитов в количестве  $13,2 \pm 0,1$  ( $p < 0,01$ ), в группе контроля данная клеточная популяция отсутствовала (рис. 1, 2). В паракортикальной зоне наблюдалось увеличение количества малых лимфоцитов  $72,4 \pm 1,1$ , по сравнению с  $60,1 \pm 1,2$  в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). Количество средних лимфоцитов в паракортикальной зоне мезентериальных лимфатических узлов увеличилось более чем в два раза по сравнению с контрольной группой ( $24,8 \pm 1,0$ ), по сравнению с контрольными значениями –  $12,1 \pm 1,1$  ( $p < 0,05$ ). Отмечалось присутствие больших лимфоцитов в паракортикальной зоне в количестве  $3,8 \pm 0,3$  ( $p < 0,01$ ), что значительно превышает контрольные значения (рис. 3, 4).

Во всех исследуемых зонах отмечалось наличие иммунобластов. Так, в зоне лимфатических фолликулов их абсолютное количество составило  $8,2 \pm 0,4$  ( $p < 0,01$ ), что более чем в три раза превышает контрольные значения. Количество иммунобластов в паракортикальной зоне практически не отличалось от их количества в контрольной группе, но в зоне мозговых тяжей их присутствие превышало контрольные значения более чем в два раза.

Абсолютное количество плазмочитов также серьезно варьирует в зависимости от исследуемой зоны, находясь в пределах от  $1,5 \pm 0,3$  (зона лимфатических фолликулов) до  $38,4 \pm 3,4$  (зона мозговых тяжей) и значительно

превышает контрольные показатели в тех же зонах. Наличие данных клеток в паракортикальной зоне составляет  $1,72 \pm 0,2$  ( $p < 0,001$ ), что в два раза больше соответствующих показателей в контроле.

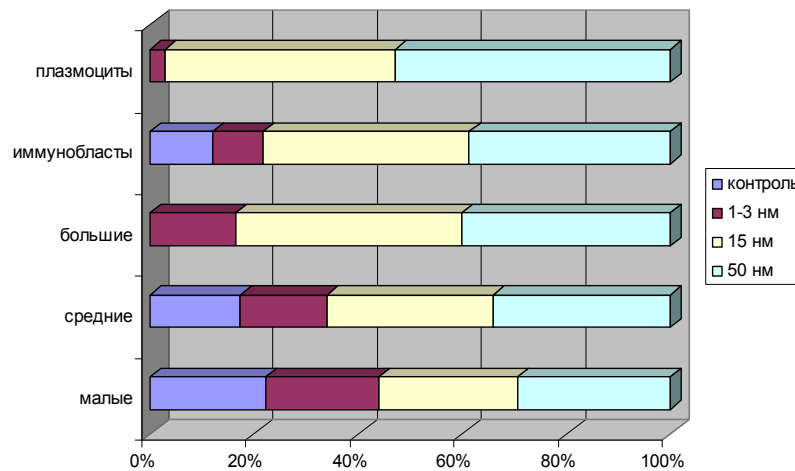


Рис. 1. Динамика изменений клеточных популяций в корковом веществе лимфатических узлов при введении ЗНЧ

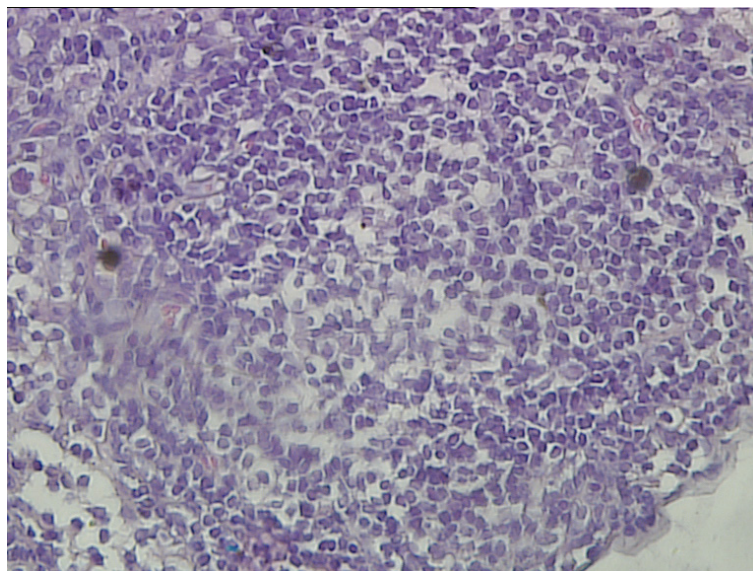


Рис. 2. Лимфатический фолликул коркового вещества лимфатического узла при введении 50 нм ЗНЧ.  $\times 400$

Во всех исследуемых зонах отмечалось усиление митотической активности, что проявлялось в увеличении количества фигур митоза. Их абсолютное количество значительно превышало соответствующие показатели в контрольной группе.

При исследовании гистологических препаратов животных третьей опытной группы, которым вводились ЗНЧ диаметром 50 нм, в зоне лимфатических фолликулов отмечалось увеличение количества малых лимфоцитов ( $84,3 \pm 1,3$ ;

$p < 0,01$ ) по сравнению с контрольной группой. Количество средних лимфоцитов в указанной зоне также превышало значения группы контроля почти в два раза, количество больших лимфоцитов составило  $12,5 \pm 1,3$ .

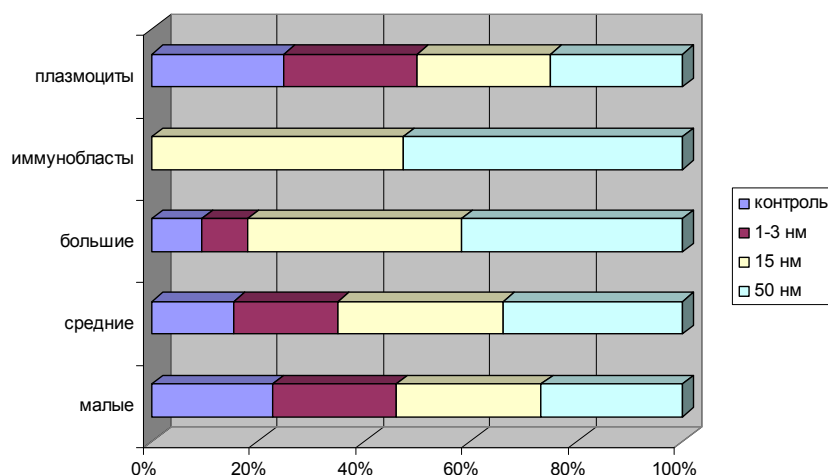


Рис. 3. Динамика изменений клеточных популяций в паракортикальной зоне лимфатических узлов при введении ЗНЧ

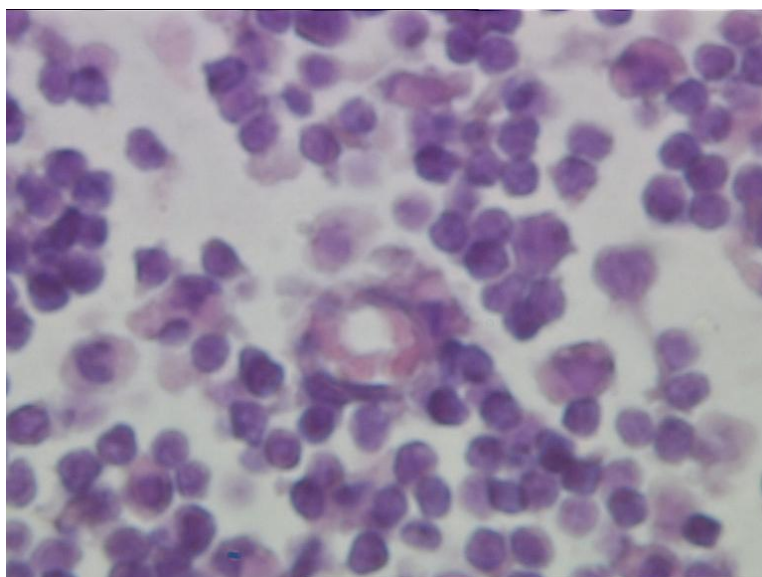


Рис. 4. Паракортикальная зона лимфатического узла при введении 15 нм ЗНЧ.  $\times 1500$

В паракортикальной зоне лимфатического узла обнаружено значительное увеличение количества малых ( $70,2 \pm 1,6$ ,  $p < 0,001$ ), средних ( $26,6 \pm 0,8$ ,  $p < 0,001$ ) и больших лимфоцитов ( $3,3 \pm 0,2$ ,  $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольной группой (рис. 1).

В зоне мозговых тяжей количество малых лимфоцитов не изменялось, а количество средних и больших лимфоцитов достоверно увеличивалось по сравнению с контролем (рис. 5, 6).

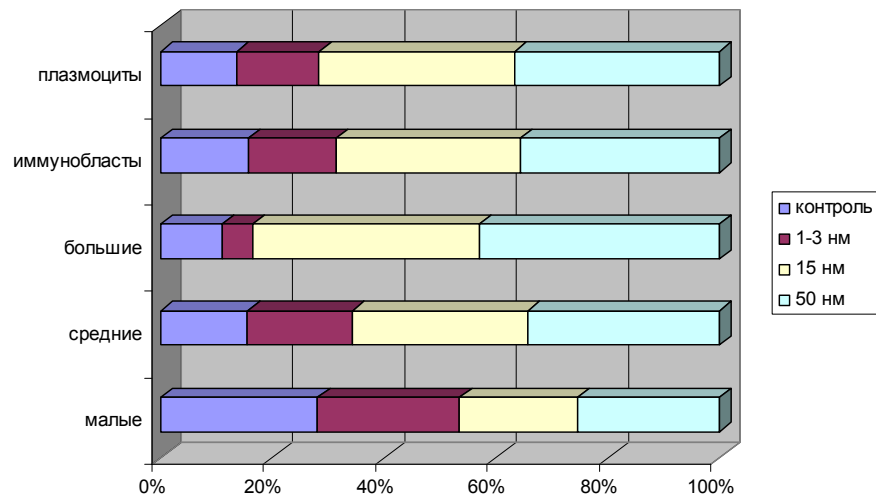


Рис. 5. Динамика изменений клеточных популяций в зоне мозговых тяжей лимфатических узлов при введении ЗНЧ

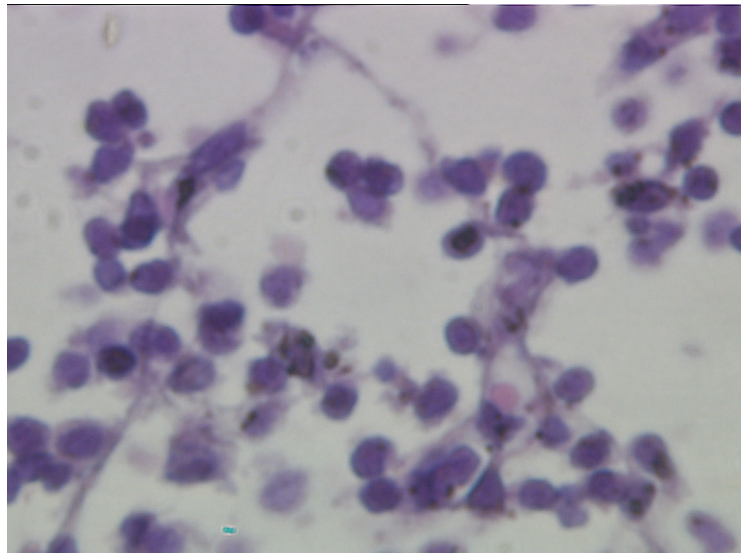


Рис. 6. Зона мозговых тяжей лимфатического узла при введении 15 нм ЗНЧ.  $\times 1500$

Количество иммунобластов в данной группе изменяется в зависимости от исследуемой области. В зоне лимфатических фолликулов их количество составляет  $2,9 \pm 0,1$  ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольными значениями ( $0,8 \pm 0,3$ ,  $p < 0,05$ ). В паракортикальной зоне их количество существенно увеличивается, но максимального уровня достигает в зоне мозговых тяжей ( $5,2 \pm 1,0$ ,  $p < 0,01$ ).

### Выводы

Анализируя полученные данные, можно отметить, что динамические изменения состава клеточных популяций лимфатических узлов экспериментальных животных при пролонгированном пероральном введении ЗНЧ проявлялись усилением процессов дифференцировки и созревания. Это выража-

ется в повышении количества иммунобластов и больших лимфоцитов в структурных зонах лимфатических узлов. Отмечается также значительное увеличение количества клеток плазмочитарного ростка, наиболее заметное в зоне мозговых тяжей.

Описанная морфологическая картина мезентериальных лимфатических узлов вполне согласуется с данными литературы [2, 3, 6] о цитологических и функциональных перестройках периферических органов иммуногенеза под влиянием различных воздействий. Изменение количества клеточных элементов (малых, средних, больших лимфоцитов и иммунобластов) в структурных зонах лимфатических узлов служит морфологическим подтверждением активации процессов миграции, пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

Таким образом, обнаруженные изменения в мезентериальных лимфоузлах после введения ЗНЧ указывают на вполне определенную и отчетливую тенденцию к развитию процессов пролиферации и дифференцировки клеточных элементов. Этот факт дает основание для предположения о стимулирующем влиянии ЗНЧ размером 15 нм и особенно 50 нм на иммунокомпетентные клетки лимфатических узлов.

### *Список литературы*

1. **Дыкман, Л. А.** Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение / Л. А. Дыкман, В. А. Богатырев, С. Ю. Щеголев, Н. Г. Хлебцов. – М. : Наука, 2008. – 319 с.
2. **Jain, K. K.** A Handbook of Nanomedicine / K. K. Jain, N. J. Totowa. – Humana : Springer, 2008. – 251 p.
3. **Boisselier, E.** Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity / E. Boisselier, D. Astruc // Chem. Rev. – 2009. – V. 38. – P. 1759–1782.
4. **Хлебцов, Н. Г.** Биораспределение и токсичность золотых наночастиц / Н. Г. Хлебцов, Л. А. Дыкман // Российские нанотехнологии. – 2011. – Т. 6, № 1–2. – С. 1–21.
5. **Khlebtsov, N. G.** Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies / N. G. Khlebtsov, L. A. Dykman // Chem. Soc. Rev. – 2011. – DOI: 10.1039/c0cs000. – 18 с.
6. **Yen, H.-J.** Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes / H.-J. Yen, S.-H. Hsu, Ch.-L. Tsai // Small. – 2009. – V. 5. – P. 1553–1561.
7. **Alkilany, A. M.** Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? / A. M. Alkilany, C. J. Murphy // J. Nanopart. Res. – 2010. – V. 12. – P. 2313–2333.
8. **Автандилов, Г. Г.** Медицинская морфометрия : руководство / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1990. – 384 с.

---

**Злобина Ольга Вячеславовна**

ассистент, кафедра гистологии,  
Саратовский государственный  
медицинский университет  
им. В. И. Разумовского

E-mail: zlobinaow@rambler.ru

**Zlobina Olga Vyacheslavovna**

Assistant, sub-department of histology,  
Saratov State Medical University  
named after V. I. Razumovsky

***Бугаева Ирина Олеговна***

доктор медицинских наук, профессор,  
заведующая кафедрой гистологии,  
Саратовский государственный  
медицинский университет  
им. В. И. Разумовского

E-mail: bugaeva@sgmu.ru

***Bugaeva Irina Olegovna***

Doctor of medical sciences, professor,  
head of sub-department of histology,  
Saratov State Medical University  
named after V. I. Razumovsky

***Пахомий Светлана Сергеевна***

ассистент, кафедра патологической  
анатомии, Саратовский государственный  
медицинский университет  
им. В. И. Разумовского

E-mail: s-firsova03@rambler.ru

***Pakhomiy Svetlana Sergeevna***

Assistant, sub-department of pathologic  
anatomy, Saratov State Medical  
University named after V. I. Razumovsky

***Бучарская Алла Борисовна***

кандидат биологических наук,  
руководитель Научно-образовательного  
центра фундаментальной медицины  
и нанотехнологий, Саратовский  
государственный медицинский  
университет им. В. И. Разумовского

E-mail: allaalla\_72@mail.ru

***Bucharskaya Alla Borisovna***

Candidate of biological sciences,  
director of the Research and educational  
center of fundamental medicine  
and nano-technologies, Saratov  
State Medical University  
named after V. I. Razumovsky

***Маслякова Галина Никифоровна***

доктор медицинских наук, профессор,  
заведующая кафедрой патологической  
анатомии, Саратовский государственный  
медицинский университет  
им. В. И. Разумовского

E-mail: gmaslyakova@yandex.ru

***Maslyakova Galina Nikiforovna***

Doctor of medical sciences, professor,  
head of sub-department of pathologic  
anatomy, Saratov State Medical University  
named after V. I. Razumovsky

---

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

**Морфофункциональное состояние мезентериальных лимфатических узлов при воздействии золотых наночастиц в эксперименте /**  
О. В. Злобина, И. О. Бугаева, С. С. Пахомий, А. Б. Бучарская, Г. Н. Маслякова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2012. – № 1 (21). – С. 3–10.