

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДОНОРОВ ПОСЛЕ ИНКУБАЦИИ С НАНОЧАСТИЦАМИ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

И.А. Колбин, О.Л. Колесников
ЧелГМА, г. Челябинск

Проведено изучение функциональной активности нейтрофилов периферической крови доноров при инкубации с наночастицами диоксида кремния в концентрациях $1,08 \cdot 10^{13}$, $0,54 \cdot 10^{13}$ и $0,27 \cdot 10^{13}$ частиц/мл. Средний диаметр частиц составил 9 нм. Время инкубации – 3 часа. Во всех опытных пробах отмечено достоверное уменьшение количества жизнеспособных клеток по сравнению с контролем. Было показано, что наночастицы диоксида кремния способны активировать нейтрофилы. Наибольший эффект активации наблюдался при воздействии наночастиц диоксида кремния в концентрации $1,08 \cdot 10^{13}$ частиц/мл.

Ключевые слова: наночастицы диоксида кремния, нейтрофилы периферической крови, жизнеспособность, функциональная активность.

Наночастицы – инженерно спроектированные микроскопические образования, имеющие размеры не более 100 нм. По заданию Роспотребнадзора в ГУ НИИ питания РАМН совместно с рядом научно-исследовательских учреждений РАН, РАМН и РАСХН, а также МГУ им. М.В. Ломоносова был разработан проект «Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, токсичности, методов идентификации и количественного определения наноматериалов», который был утвержден постановлением Главного Государственного санитарного врача РФ №79 от 31.10.07 [7]. В литературе различают естественные и искусственные наночастицы. Естественные биологические и небιологические наночастицы не являются новыми факторами для человека. Примером естественных биологических наночастиц являются вирусы, небιологических – компоненты дымов от сгорания моторных топлив, сварочного аэрозоля, входят в состав воздуха, воды, почв, донных отложений, образуются в значительных количествах при лесных пожарах и вулканических извержениях, а также в результате функционирования теплоэлектростанций и в других высокотемпературных технологических процессах. Искусственные наночастицы были созданы сравнительно недавно и представляют новый фактор воздействия на окружающую среду и организм человека [5]. Области применения современных наноматериалов разнообразны и включают биомедицину, химическую промышленность, оптику, энергетику, строительство, электронику, косметологию, производство пищевых продуктов и товаров народного потребления [8]. Но в то же время возникают сложные научные проблемы, связанные с воздействием наночастиц на организм человека, и опасность вмешательства нанофактора в процессы физиологиче-

ской жизнедеятельности, протекающие в клетке, а отсюда вопросы – как поведут себя искусственно собранные наночастицы, каковы будут особенности их метаболизма в клетке, воздействуя на систему рецептор-медиатор, как будет протекать транспорт токсиканта в клетке, а также возможность влияния на механизмы регуляции синтеза белка и на генные структуры в клетке [6].

Согласно современным данным самым распространенным в биосфере нашей планеты после кислорода является кремний. Он входит в состав атмосферного воздуха, песка, кварца, горного хрусталя, стекла. Мышечная ткань человека содержит $(1-2) \cdot 10^{-2} \%$ кремния, костная ткань – $17 \cdot 10^{-4} \%$, кровь – 3,9 мг/л. С пищей в организм человека ежедневно поступает до 1 г кремния. Анализ данной литературы показал, что наночастицы обладают более высокой токсичностью по сравнению с обычными микрочастицами [2]. Есть данные, что в форме наночастиц различные материалы приобретают новые, ранее неприсущие им свойства и биологические свойства [4]. Установлено, что наночастицы обладают высокой проникающей способностью: легко проникают через мембраны клеток, обнаруживаются в клеточном ядре, преодолевают гематоэнцефалический барьер, циркулируют и накапливаются в органах и тканях, вызывая выраженные патоморфологические поражения внутренних органов, а также обладают длительным периодом полувыведения. Эффекты, вызванные попаданием наночастиц в мозг, сердечно-сосудистую систему, печень и другие жизненно важные органы могут быть опасны для здоровья и жизни человека и животных. Наночастицы обладают большой удельной поверхностью, что увеличивает их адсорбционную ёмкость и каталитические свойства. Это может приводить к увеличению продукции

свободных радикалов и активных форм кислорода и далее – к повреждению биоструктур (белки, липиды, нуклеиновые кислоты) [7]. Токсичность наночастиц зависит от формы, размера, и других физико-химических особенностей строения, а также дозы, способа введения, концентрации и продолжительности влияния на организм [2].

Токсичность наночастиц диоксида кремния для животных и человека изучена слабо, однако широта спектра их применений ставит их на одно из первых мест в списке наночастиц, требующих детального изучения их биологических свойств.

Одними из главных представителей клеток иммунной системы, а также клетками «первой линии» противoinфекционной защиты – являются нейтрофильные гранулоциты. Содержимое их первичных, вторичных и третичных гранул богато огромным спектром биологически активных продуктов. При активации нейтрофильные гранулоциты решают свои эффекторные задачи одним из двух способов: либо с помощью фагоцитоза, либо путем активации биологически активных веществ [3].

Приведенные факты свидетельствуют о необходимости проведения научно-исследовательских работ, касающихся токсичности, положительных или отрицательных биологических эффектов наночастиц и их биобезопасности. На данном этапе решения этой задачи возможность влияния наночастиц диоксида кремния на клетки иммунной системы человека остается открытым. Данных о токсическом влиянии наночастиц диоксида кремния на нейтрофильные гранулоциты нами не встретилось.

Цель работы: проанализировать функциональную активность нейтрофилов периферической крови после 3-часовой инкубации с наночастицами SiO_2 в концентрациях $1,08 \cdot 10^{13}$, $0,54 \cdot 10^{13}$ и $0,27 \cdot 10^{13}$ частиц/мл.

Материалы и методы. Объектом исследования были нейтрофилы, выделенные из периферической венозной крови доноров в возрасте 18–35 лет. Нейтрофилы выделяли из лейкоцитарной взвеси на двойном градиенте плотности растворов фиколаверографина. Плотность верхнего слоя составила 1,075–1,077, нижнего 1,093–1,095. После центрифугирования в течение 40 мин при 1500 об/мин нейтрофилы аккуратно собирали пипеткой, переносили в стерильные центрифужные пробирки, трижды отмывали раствором Хенкса с последующим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 минут. Клеточную взвесь стандартизировали до концентрации $5 \cdot 10^6$ клеток/мл путем подсчета в камере Горяева. Клетки инкубировали в присутствии различных концентраций ($1,08 \cdot 10^{13}$, $0,54 \cdot 10^{13}$ и $0,27 \cdot 10^{13}$ частиц/мл) наночастиц в течение 3 часов. Диаметр наночастиц составлял 9 нм. Наночастицы SiO_2 были любезно предоставлены НОЦ ЮУрГУ «Материаловедения и нанотехнологий» (руководитель – профессор Сапожников С.Б.), за что авторы выражают глубокую благодарность. Жизнеспособность клеток в культуре оценивали стандартным суправитальным окрашиванием

1 %-ным раствором трипанового синего. Окрашивание нейтрофилов проводили в суспензии клеток. Для этого 0,2 мл взвеси нейтрофилов в физиологическом растворе смешивали с 0,02 мл 1 %-ного раствора трипанового синего, ресуспендировали. Клетки помещали в камеру Горяева и исследовали в световом микроскопе. Живые клетки были прозрачными (трипанонегативные клетки), мертвыми считались клетки, которые были окрашены в фиолетовый цвет (трипанопозитивные клетки). Подсчет производили на 100 клеток, результат выражали в процентах. Общее количество клеток подсчитывали также в камере Горяева, стандартным методом подсчета лейкоцитов. Функциональный ответ нейтрофилов крови оценивали по фагоцитарной активности нейтрофилов на модели поглощения частиц полистирольного латекса. Для этого смешивали 0,2 мл суспензии нейтрофилов в физиологическом растворе с 0,04 мл взвеси частиц полистирольного латекса, диаметром 1,7 мкм, и концентрацией 10^8 частиц/мл. После 30-минутной инкубации при температуре 37°C из клеток готовили препараты, которые высушивали на воздухе, фиксировали 96° этиловым спиртом и окрашивали по Романовскому-Гимзе. С помощью иммерсионной микроскопии рассчитывали активность фагоцитоза – процент нейтрофилов, захвативших хотя бы одну частицу латекса, интенсивность фагоцитоза – число поглощенных микросфер латекса в 100 подсчитанных нейтрофилах. С помощью спонтанного и индуцированного НСТ-теста проводилось определение способности к выработке активных форм кислорода. Метод основан на учете интенсивности восстановления клетками нитросинего тетразолия (НСТ) в его нерастворимую форму – диформаза. При этом темные гранулы диформаза выпадают внутри нейтрофилов и на их цитоплазматической мембране. НСТ-тест проводили в двух вариантах: спонтанном (базальном) и индуцированном (стимулированном). Для постановки реакции вносили по 0,2 мл взвеси нейтрофилов в физиологическом растворе. В одну из них добавляли 0,04 мл физиологического раствора, во вторую добавляли 0,04 мл суспензии латекса (диаметр частиц 1,7 мкм, концентрация 10^8 частиц/мл). После этого во все пробирки вносили по 0,1 мл 0,2 %-ного раствора НСТ. Инкубировали в течение 30 мин при 37°C , после инкубации материал центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин, из осадка готовили мазки, высушивали на воздухе, фиксировали 96° этиловым спиртом и окрашивали 0,005 %-ным водным раствором сафранина в течение 5 минут. Учет проводили с помощью световой микроскопии по количеству гранул диформаза в нейтрофилах, используя полуколичественный метод оценки в «крестах». Определяли процент клеток, восстанавливающих НСТ (активность НСТ-теста), и интенсивность реакции восстановления НСТ. Для этого НСТ-позитивные клетки делили на 3 группы: 1 – клетки с единичными гранулами диформаза в цитоплазме (+), 2 – клетки с цито-

плазмой, наполовину заполненной гранулами диформаза (+), 3 – клетки с цитоплазмой, полностью заполненной диформазаном (+++). Для получения коэффициента интенсивности реакции количество клеток, оцененных в один крест, умножали на 1, в два креста – на 2, в три креста – на 3. Результаты суммировали и делили на 100. Прижизненное исследование интенсивности люминесценции лизосом в цитоплазме фагоцитов, окрашенных акридиновым оранжевым, является одним из методов оценки состояния лизосомального аппарата клеток. Окрашивание нейтрофилов проводили в суспензии клеток. Для этого 0,2 мл взвеси

нейтрофилов в физиологическом растворе соединили с 0,02 мл раствора акридинового оранжевого в концентрации 2 мкг/мл. Клетки инкубировали 30 мин при 37 °С. Клеточную взвесь помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и микроскопировали под масляной иммерсией в потоке сине-фиолетового света люминесцентного микроскопа. Определяли лизосомальную активность – число нейтрофилов, имеющих лизосомальные гранулы (%) [3]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica 6.0, с вычислением средней арифметической и ее стан-

Показатели функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при активации разными концентрациями наночастиц SiO₂ (n = 10)

Показатели функциональной активности	Концентрации наночастиц диоксида кремния (×10 ¹³ частиц/мл)			
	Контроль Группа 1	0,27 Группа 2	0,54 Группа 3	1,08 Группа 4
Содержание жизнеспособных нейтрофилов, %	97,22 ± 1,15	94,77 ± 1,16	93,0 ± 1,4 p ₁₋₃ = 0,02	83,77 ± 2,39 p ₁₋₄ = 0,004 p ₂₋₄ = 0,02 p ₃₋₄ = 0,04
Общее количество нейтрофилов, ×10 ⁶ кл/мл	4,77 ± 0,11	4,05 ± 0,17 p ₁₋₂ = 0,003	3,49 ± 0,22 p ₁₋₃ = 0,001 p ₂₋₃ = 0,04	2,56 ± 0,2 p ₁₋₄ = 0,0003 p ₂₋₄ = 0,0003 p ₃₋₄ = 0,01
Абсолютное количество жизнеспособных клеток, ×10 ⁶ кл/мл	4,64 ± 0,11	3,85 ± 0,19 p ₁₋₂ = 0,01	3,23 ± 0,19 p ₁₋₃ = 0,0005	2,12 ± 0,15 p ₁₋₄ = 0,0003 p ₂₋₄ = 0,0003 p ₃₋₄ = 0,001
Активность фагоцитоза, %	84,5 ± 1,79	91,9 ± 1,55 p ₁₋₂ = 0,006	86,2 ± 1,67 p ₂₋₃ = 0,02	92,9 ± 1,32 p ₁₋₄ = 0,001 p ₃₋₄ = 0,009
Интенсивность фагоцитоза, усл. ед.	5,74 ± 0,5	7,93 ± 0,32 p ₁₋₂ = 0,004	6,83 ± 0,4	8,75 ± 0,42 p ₁₋₄ = 0,001 p ₃₋₄ = 0,006
Активность спонтанного НСТ-теста, %	21,1 ± 1,5	27,6 ± 1,9 p ₁₋₂ = 0,03	33,5 ± 2,3 p ₁₋₃ = 0,0007	63,2 ± 4,4 p ₁₋₄ = 0,0001 p ₂₋₄ = 0,0001 p ₃₋₄ = 0,0002
Интенсивность спонтанного НСТ-теста, усл. ед.	0,36 ± 0,02	0,52 ± 0,04 p ₁₋₂ = 0,002	0,87 ± 0,02 p ₁₋₃ = 0,0001 p ₂₋₃ = 0,0006	1,81 ± 0,04 p ₁₋₄ = 0,0001 p ₂₋₄ = 0,0001 p ₃₋₄ = 0,0001
Активность индуцированного НСТ-теста, %	37,9 ± 1,4	54,0 ± 2,9 p ₁₋₂ = 0,001	52,7 ± 3,0 p ₁₋₃ = 0,002	64,2 ± 2,3 p ₁₋₄ = 0,0001 p ₂₋₄ = 0,02 p ₃₋₄ = 0,01
Интенсивность индуцированного НСТ-теста, усл. ед.	0,66 ± 0,05	0,76 ± 0,04	1,12 ± 0,05 p ₁₋₃ = 0,0004 p ₂₋₃ = 0,0002	1,89 ± 0,03 p ₁₋₄ = 0,0001 p ₂₋₄ = 0,0001 p ₃₋₄ = 0,0001
Лизосомальная активность, %	66,7 ± 1,7	67,6 ± 3,0	89,1 ± 1,7 p ₁₋₃ = 0,001 p ₂₋₃ = 0,0001	99,0 ± 0,3 p ₁₋₄ = 0,0001 p ₂₋₄ = 0,001 p ₃₋₄ = 0,0002

дартной ошибки ($M \pm m$). Достоверность различий между изучаемыми группами оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни [1].

Результаты. В течение 3-часовой инкубации нейтрофилов с различными концентрациями ($0,27 \cdot 10^{13}$, $0,54 \cdot 10^{13}$ и $1,08 \cdot 10^{13}$ частиц/мл) наночастиц диоксида кремния жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов с увеличением концентрации снижается по сравнению с контролем (см. таблицу).

В концентрации $0,54 \cdot 10^{13}$ частиц/мл – в 1,04 раза и $1,08 \cdot 10^{13}$ частиц/мл – в 1,16 раза. При оценке общего количества клеток показатели достоверно уменьшались: в концентрации $0,27 \cdot 10^{13}$ частиц/мл – в 1,17 раза, в концентрации $0,54 \cdot 10^{13}$ частиц/мл – в 1,36 раза и $1,08 \cdot 10^{13}$ частиц/мл – 1,86 раза по сравнению с контролем (см. таблицу). Соответственно, количество жизнеспособных клеток также достоверно снижалось при использовании всех концентраций наночастиц диоксида кремния.

При исследовании состояния функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов была отмечена активация клеток. Активность фагоцитоза в концентрации $0,27 \cdot 10^{13}$ частиц/мл возросла 1,08 раза, в концентрации $1,08 \cdot 10^{13}$ частиц/мл в 1,09 раза по сравнению с контрольной группой. Аналогичная тенденция прослеживалась и в показателях интенсивности фагоцитоза. В наименьшей концентрации интенсивность возросла в 1,38 раза, в максимальной концентрации в 1,52 раза. В концентрации $0,54 \cdot 10^{13}$ частиц/мл достоверных отличий не отмечено (см. таблицу).

Спонтанная НСТ-редуцирующая активность нейтрофилов была достоверно увеличена в концентрации $0,27 \cdot 10^{13}$ частиц/мл в 1,3 раза, $0,54 \cdot 10^{13}$ частиц/мл в 1,58 раза и в концентрации $1,08 \cdot 10^{13}$ частиц/мл в 2,99 раза по сравнению с контрольной группой. Индуцированная НСТ-редуцирующая активность нейтрофилов была также достоверно увеличена: в 1,4, 1,39 и 1,69 раза по сравнению с контролем. Необходимо отметить, что в концентрации $1,08 \cdot 10^{13}$ частиц/мл между показателями активности спонтанного и индуцированного НСТ-тестов происходит снижение резерва бактерицидной функции нейтрофилов. Лизосомальная активность была увеличена в концентрации $0,54 \cdot 10^{13}$ частиц/мл в 1,33, а в $1,08 \cdot 10^{13}$ частиц/мл 1,48 раза (см. таблицу). В доступной литературе аналогичных данных по исследуемой проблеме нами не встретилось.

Заключение. Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что наночастицы диоксида кремния активируют нейтрофильные гранулоциты. Наибольший эффект наблюдается в концентрации $1,08 \cdot 10^{13}$ частиц/мл, а наименьший – $0,27 \cdot 10^{13}$ частиц/мл. При этом предположительно нейтрофильные гранулоциты при действии наночастиц диоксида кремния акти-

вируются, усиливаются метаболические процессы, протекающие в клетке, с последующей активацией функциональной активности с истощением бактерицидных потенциалов. После чего клетки разрушаются по типу некроза. Не исключена и активация механизмов апоптоза. По литературным данным жизнеспособность макрофагов после инкубации с частицами кремния в концентрации 50 мкг/мл уменьшилась в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой [10]. Также была отмечена активация моноцитов, перитонеальных макрофагов при воздействии частиц кремния. В результате клетки высвобождали большое количество ИЛ-1 и впоследствии подвергались апоптозу [9, 10].

Литература

1. Боровиков, В.П. *STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов* / В.П. Боровиков. – СПб.: Питер, 2001. – 656 с.
2. Глушкова, А.В. *Нанотехнологии и нанотоксикология – взгляд на проблему* / А.В. Глушкова, А.С. Радилев, В.Р. Рембовский // *Токсикологический вестник*. – 2007. – № 6. – С. 4–8.
3. Долгушин, И.И. *Нейтрофилы и гомеостаз* / И.И. Долгушин, О.В. Бухарин. – Екатеринбург: Изд-во УрОРАН, 2001. – 288 с.
4. Дурнев, А.Д. *Токсикология наночастиц* / А.Д. Дурнев // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2008. – Т. 145, № 1. – С. 78–80.
5. Измеров, Н.Ф. *Нанотехнологии и наночастицы – состояние проблемы и задачи медицины труда* / Н.Ф. Измеров, А.В. Ткач, Л.А. Иванова // *Медицина труда и промышленная экология*. – 2007. – № 8. – С. 1–4.
6. Курляндский, Б.А. *О нанотехнологии и связанных с ней токсикологических проблемах* / Б.А. Курляндский // *Токсикологический вестник*. – 2007. – № 6. – С. 2–3.
7. Онищенко, Г.Г. *О концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов* / Г.Г. Онищенко, В.А. Тутельян // *Вопросы питания*. – 2007. – Т. 76, № 6. – С. 4–8.
8. Хотимченко, С.А. *Проблема обеспечения безопасности наноразмерных объектов для здоровья человека* / С.А. Хотимченко, И.В. Гмошинский // *Гигиена и санитария*. – 2009. – № 5. – С. 7–11.
9. Kostura, M.Y. *Identification of a monocyte specific IL – 1 convertase activity* / M.Y. Kostura // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2000. – P. 5227–5231.
10. M'hammed Sarih, Spancer C. Brown. *Silica induces apoptosis in macrophages and release of interleukin – 1 α and interleukin – 1 β* // *Institut de Biochimie, Universite Paris – Sud, France*. – 2001. – P. 407–414.

Поступила в редакцию 26 января 2011 г.