

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖИВОТНЫХ

В эксперименте изучено влияние наночастиц Cu, Fe и Fe-Co на морфологические показатели периферической крови при однократном внутримышечном введении. Установлено, что введение лиозолей наночастиц приводит к повышению уровня лейкоцитов, а также способствует увеличению количества эритроцитов.

Ключевые слова: наночастицы, эритроциты, лейкоциты.

По мере развития учения о пищевых источниках микронутриентов стала очевидной необходимость замены минеральных форм микроэлементов на более биологически доступные и менее токсичные органические соединения [1]. Последние получают все большее распространение в практике [2], [3]. Между тем помимо органических форм определенным интерес представляют другие источники микроэлементов, в частности наночастицы металлов [4], которые в силу целого ряда характеристик: меньшей токсичности [5]; биодоступности [4] и др., способны эффективно заменять органические формы.

Материалы и методы

Исследования проводились на крысах-самцах линии Vistar массой 150–180 г, находящихся на общевиварийном рационе кормления. Лабораторным животным в рамках отдельных групп аналогов внутримышечно вводили водные лиозоли наночастиц меди, железа и Fe-Co в дозе 2.0 мг/кг массы животного: 1 группе – медь; 2 – железо; 3 – Fe-Co, 4 (контроль) – дистиллированную воду.

Кровь получали путем декапитации у предварительно наркотизированных животных через 1 и 7 суток (n=3).

Экспериментальные исследования на животных проводили в соответствии с инструкциями, рекомендуемыми Российским Регламентом, 1987 г. и «The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D.C. 1996)».

В эксперименте использовались наночастицы меди (103±2 нм), железа (80±5 нм) и наночастицы Fe-Co (Fe – 70%; Co – 30%; 90±2 нм) сферической формы, полученные методом высокотемпературной конденсации на установке «МиГен» [5], [6] и предоставленные д.б.н. Н.Н. Глуценко (Институтом энергетических проблем химической физики РАН, Москва). Размеры наночастиц меди и железа были определены с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM 7401F, размеры наночастиц Fe-Co с помощью атомно-силового микроскопа SMM-2000. Приготовление водных лиозолей наночастиц проводили путем диспергирования (f – 35 кГц, N – 300 (450) Вт, A – 10 мкм) точной навески порошка в течение 30 мин.

Гематологические показатели определяли с помощью автоматического гематологического анализатора Medonic M16. В стабилизированной гепарином или трилоном Б крови определяли содержание лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, процентное отношение и количественное содержание отдельных видов лейкоцитов; концентрацию гемоглобина и среднее содержание гемоглобина в одном эритроците.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 и программного пакета MS Excel 2007.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 и программного пакета MS Excel 2007.

Результаты исследований

Как показали исследования, внутримышечное введение лабораторным животным водных лиозолей наночастиц сопровождается неоднозначными изменениями энтеральных характеристик подопытных животных.

Так, введение лиозолей приводит к достоверному увеличению количества лейкоцитов относительно контрольных значений на 39,2 и 74,6% (p≤0,05) в 1 и 3 группах спустя сутки,

и на 7,9 ($p \leq 0,05$); 16,4 и 14,9 ($p \leq 0,05$)% в 1, 2 и 3 группах соответственно на 7 сутки (табл. 1).

Количественное содержание отдельных видов лейкоцитов изменялось следующим образом:

- содержание лимфоцитов было достоверно выше контрольных значений во всех опытных группах, а именно на 32,5 ($p \leq 0,001$)% в первой группе; на 1,25 ($p \leq 0,001$)% – во второй группе; на 67,5 ($p \leq 0,001$)% – в третьей группе через сутки, и на 7,6; 17,6 и 17,2 ($p \leq 0,001$)% в тех же группах соответственно через 7 суток;

- содержание гранулоцитов также достоверно увеличивалось относительно контроля на 53,8 ($p \leq 0,001$); 15,3 и 98,7 ($p \leq 0,001$)% в 1, 2 и 3 группах соответственно спустя сутки, и на 3,5 ($p \leq 0,001$); 10,5 и 3,5 ($p < 0,001$)% в 1, 2 и 3 группах соответственно через 7 суток;

- содержание моноцитов в 1 и 3 группах достоверно ($p \leq 0,001$) превышало контрольные значения более чем в 2 раза, а во второй группе на 19,1 ($p \leq 0,001$)% через сутки; и на 7,6 ($p \leq 0,001$) – в первой группе, 13,9 и 11,4 ($p \leq 0,001$)% во второй и третьей группах соответственно на 7 сутки.

В процентном отношении отдельных видов лейкоцитов наблюдался незначительный сдвиг в сторону увеличения процента моноцитов и гранулоцитов, и незначительного снижения

процента лимфоцитов относительно контрольных значений спустя сутки во всех опытных группах, тогда как на 7 сутки во всех опытных группах наблюдалась обратная ситуация (рис. 1).

В отношении количества эритроцитов также наблюдались изменения: было выявлено увеличение содержания эритроцитов относительно контроля на 34,2% в первой группе, на 15,04% и 26,6% – во второй и третьей группах соответственно через сутки, и на 5,3, 9,5 и 4,5% в 1, 2 и 3 группах соответственно через 7 суток (табл. 2).

Анализ среднего содержания гемоглобина в эритроците и концентрации гемоглобина показали следующие изменения: опытные значения среднего содержания гемоглобина в эритроците были выше контрольных во всех опытных группах на 12-13% спустя сутки, и на 1-3% через 7 суток; концентрация гемоглобина также превышала опытные значения на 67,3% в первой группе и на 45,7% – во второй и третьей группах через сутки, и на 3,2, 10 и 7,8% в 1, 2 и 3 группах соответственно на 7 сутки.

Изменения в количестве тромбоцитов наблюдались в снижении их содержания на 8,4; 10,7 и 11,4% в 1,2 и 3 группах относительно контроля

Таблица 1. Количественные показатели лейкоцитов и их отдельных видов в крови крыс-самцов линии Vistar при однократно введении в организм наночастиц меди, железа, Fe-Co

Показатель	Группа	Время после инъекции, сут.	
		1	7
Лейкоциты, $10^{12}/л$	1	13,6±1,4*	8,2±4,45*
	2	9,9±1,5*	8,85±0,55*
	3	17,1±1,18*	8,73±0,55*
	4	9,767±0,409	7,600±3,371
Лимфоциты, $10^{12}/л$	1	10,6±0,01***	6,46±0,03***
	2	8,1±0,04***	7,05±0,02***
	3	13,4±0,06***	6,963±0,09***
	4	8±0,01	5,95±0,04
Гранулоциты, $10^{12}/л$	1	1,2±0,7***	0,89±0,01***
	2	0,9±0,001***	0,95±0,01***
	3	1,55±0,02***	0,89±0,04***
	4	0,78±0,05	0,86±0,02
Моноциты, $10^{12}/л$	1	1,8±0,03***	0,85±0,002***
	2	1,±0,01***	0,9±0,01***
	3	2,1±0,03***	0,88±0,01***
	4	0,84±0,02	0,79±0,01

* – при $p \leq 0,05$; *** – при $p \leq 0,001$

через сутки, и на 14,2; 9,9 и 18,9% в 1, 2 и 3 группах соответственно через 7 суток.

Сравнивая описанные эффекты исследуемых наночастиц между собой можно отметить следующее:

1) Уровень лейкоцитов через сутки выше при введении наночастиц Fe-Co, на 35% выше чем при введении наночастиц меди и на 73,2% выше чем при введении наночастиц железа. Через 7 суток количество лейкоцитов выше при введении наночастиц железа, на 8,6 и 1,5% чем при введении наночастиц меди и Fe-Co соответственно.

2) Содержание эритроцитов выше через сутки при введении наночастиц меди, на 19,1 и 7,6% чем при введении наночастиц железа и Fe-Co, и через 7 сут. на 4–5% при введении наночастиц железа по сравнению с остальными наночастицами.

3) Концентрация гемоглобина через сутки также выше после введения наночастиц меди, на 21-22% выше по сравнению с наночастицами железа и Fe-Co, тогда как через 7 сут. величина данного показателя выше при введении наночастиц железа, на 6,8 и 2,2% выше, чем при введении наночастиц меди и Fe-Co. В отношении среднего содержания гемоглобина в 1 эритроците наблюдаются примерно одинаковые

превышения для всех наночастиц по сравнению с контролем.

В результате, наблюдаемые нами изменения, свидетельствовали о наличии ответной реакции организма на введение инородного тела, которая имела различные проявления.

Как показали исследования, введение тестируемых наночастиц ведет к достоверному увеличению уровня лейкоцитов и их отдельных видов относительно контрольных значений как через сутки (1,2 и 3 опытные группы), так и через 7 суток (4,5 и 6 опытные группы) после инъекции. При этом процентное отношение отдельных видов сдвинуто в сторону моноцитов и гранулоцитов через сутки и незначительно в сторону лимфоцитов через 7 суток. Подобные изменения, согласно литературным данным, связаны с тем, что наночастицы способны активизировать некоторые группы лейкоцитов. Так, из исследований Колбина И.А. с соавтор. [7] следует, что наночастицы диоксида кремния в концентрации $1,08 \cdot 10^{13}$ частиц/л способны активировать функциональную активность гранулоцитов, при этом активность и интенсивность фагоцитоза возрастают в 1,09 и 1,52 раза, хотя жизнеспособность самих клеток в результате снижается в 1,86 раза. При этом предположительно гранулоциты при действии наночастиц

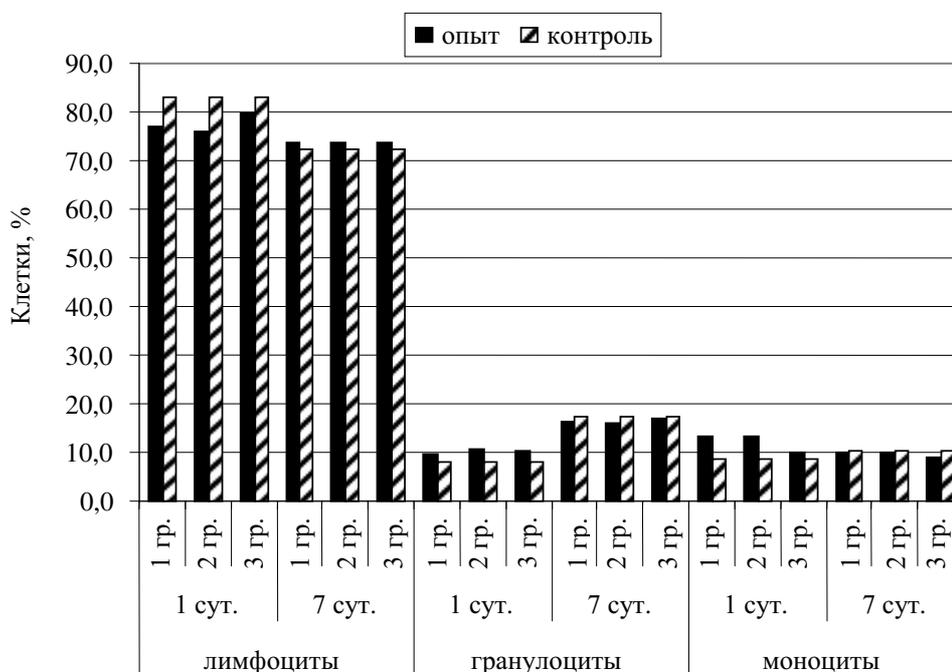


Рисунок 1. Процентное отношение отдельных видов лейкоцитов крови крыс-самцов линии Vistar при однократном введении в организм наночастиц меди, железа, Fe-Co

Таблица 2. Показатели количества эритроцитов, концентрации гемоглобина, среднего содержания гемоглобина в 1 эритроците и количества тромбоцитов крови крыс-самцов линии Vistar при однократно введении в организм наночастиц меди, железа, Fe-Co

Показатель	Группа	Время после инъекции, сут.	
		1	7
Эритроциты, $10^{12}/л$	1	7,41±0,12	5,98±1,26
	2	6,35±0,3	6,22±0,58
	3	6,99±0,37	5,93±0,54
	4	5,52±1,67	5,68± 0,61
MCH ¹ , пг	1	23,4± 0,17	22,57±3,88
	2	23,5±0,29	22,1±1,7
	3	23,75±0,202	22,2±4,05
	4	20,77±3,39	21,7±0,74
Концентрация гемоглобина, г/л	1	201,3±10,4	127,3±10,3
	2	175,3±14,1	135,7±11,7
	3	175±12,02	133±16,9
	4	120,3±25,9	123,3±21,8
Тромбоциты, $10^{12}/л$	1	518,5±38,4	507,7±86,51
	2	504,5±145,2	533±4,04
	3	501,5±89,2	479,7±49,8
	4	566±152,7	591,7±226,9

¹ MCH – среднее содержание гемоглобина в одном эритроците, пг

диоксида кремния активируются, усиливаются метаболические процессы, протекающие в клетке, с последующей активацией функциональной активности с истощением бактерицидных потенциалов. Также была отмечена активация моноцитов, перитониальных макрофагов при воздействии частиц кремния. В результате клетки высвобождали большое количество ИЛ-1 и подвергались апоптозу.

В отношении исследуемых наночастиц известны лишь единичные работы о влиянии наночастиц железа и меди на белые клетки крови [8], [9]. Так, согласно литературным данным, внутривенное введение наночастиц железа в концентрации 20 мг/кг не вызывает гибели лейкоцитов, но приводят к изменению функциональных свойств цитоплазмы с увеличением ее проницаемости, а энтеральное введение наночастиц меди в концентрации 1,7 мг/кг корма приводит к увеличению числа лейкоцитов на 39,63% ($p < 0,001$). Необходимо отметить, что хотя подобные изменения в активности клеток, как для наночастиц оксида кремния, и не описаны для исследуемых наночастиц в литературных данных, исследования по апоптозу для некоторых из них встречаются. Так, в работе Сизовой Е.А. с соавтор. [10] описано увеличение

показателя готовности клеток к апоптозу для наночастиц меди.

Помимо изменений в содержании лейкоцитов также наблюдались следующие изменения в крови животных: увеличение содержания эритроцитов, концентрации гемоглобина, среднего содержания гемоглобина в 1 эритроците и снижение уровня тромбоцитов.

В отношении содержания эритроцитов, концентрации гемоглобина и среднего содержания гемоглобина в 1 эритроците можно отметить, что полученные данные хорошо согласуются с другими литературными источниками о влиянии наночастиц на данные показатели [9], [11]. Так, в работе Скоркиной М.Ю. с соавтор. отмечаются достоверные увеличения концентрации гемоглобина на 58,4% и его среднего содержания в эритроците при введение железоксидных наночастиц.

Таким образом, результаты эксперимента показали, что внутримышечное введение наночастиц меди, железа и Fe-Co приводит к неоднозначной реакции живого организма и позволяет выделить ряд особенностей наночастиц в отношении него: увеличение числа лейкоцитов, эритроцитов, концентрации гемоглобина и его среднее содержание в эритроците.

12.10.2013

Список литературы:

1. Беденко А. Органические микроэлементы в современном животноводстве // Комбикорма – 2008. – №6. – С. 87-91.
2. Андрианова Е., Гуменюк А., Воронин Д., Голубов И. Минеральный премикс на основе L-аспаргинатов микроэлементов // Птицеводство. – 2011. – №3. – С. 16-19.
3. Шацких Е.В. Продуктивность цыплят-бройлеров при использовании в предстартовом рационе органических форм микроэлементов // Аграрный вестник Урала. – 2008. – №11(53). – С. 83-84.
4. Никонов И.Н., Фолманис Ю.Г., Фолманис Г.Э., Коваленко Л.В., Лаптев Г.Ю., Егоров И.А., Фисинин В.И., Тананаев И.Г. Наноразмерное железо – кормовая добавка для сельскохозяйственной птицы // Доклады академии наук. – 2011. – Т. 440. – №4. – С. 565-569.
5. Ген М.Я., Миллер А.В. Авторское свидетельство СССР №814432 // Бюллетень изобретений. – 1981. – №11. – С. 25.
6. Жигач А.Н., Лейпунский И.О., Кусков М.Л., Стоенко Н.И., Сторожев В.Б. Установка для получения и исследования физико-химических свойств наночастиц металлов // Приборы и техника эксперимента. – 2000. – №6. – С.122-129.
7. Колбин И.А., Колесников О.Л. Изменение показателей функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови доноров после инкубации с наночастицами диоксида кремния // Вестник ЮУрГУ. – 2001. – №20. – С. 116-119.
8. Павлов Н.А., Надеждин С.В. Реакции лейкоцитов крови крыс на растворимые и нерастворимые формы в опытах in vivo и in vitro // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2010. – Т. 21. – №13. – С. 103-106.
9. Вишняков А.И., Ушаков А.С., Лебедев С.В. Особенности костномозгового кроветворения при введении наночастиц меди per os и intramuscularly // Вестник мясного скотоводства – 2011. – Т.2. – №54. – С. 96–102.
10. Сизова Е.А. Минеральный состав и морфофункциональные аспекты реорганизации печени при энтеральном способе введения наночастиц меди типа CU10X // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2010. – №6 (112). – С. 92-94.
11. Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Сладкова Е.А., Деркачев Р.В., Забиняков Н.А. Влияние наночастиц железа на дыхательную функцию крови // Ярославский педагогический университет – 2010. – №2. – С. 101-106.

Сведения об авторах:

Яушева Елена Владимировна, аспирант Всероссийского научно-исследовательского института мясного скотоводства Россельхозакадемии, e-mail: vasilena56@mail.ru

Мирошников Сергей Александрович, директор Всероссийского научно-исследовательского института мясного скотоводства Россельхозакадемии, доктор биологических наук, профессор, e-mail: inst_bioelement@mail.ru

Кван Ольга Вилориевна, научный сотрудник института биоэлементологии Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук, e-mail: kwan111@yandex.ru

UDC 577.11

Yausheva E.V.¹, Miroshnikov S.A.¹, Kwan O.V.²

¹SSI all-Russian research Institute of meat cattle breeding of Russian agricultural Academy; ²Orenburg state university, e-mail: vniims.or@mail.ru

ESTIMATION OF INFLUENCE METAL NANOPARTICLES ON MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF PERIPHERAL BLOOD OF ANIMALS

The experiment studied the effect of nanoparticles of Cu, Fe and Fe-Co on morphological parameters of the peripheral blood after a single intramuscular injection. The incorporation liozoley nanoparticles leads to increased levels of leukocytes and increases the number of red blood cells.

Key words: nanoparticles, erythrocytes, leukocytes.

Bibliography:

1. Bedenko A. Some organic microelements used in the modern animal husbandry // Mixed Feed – 2008. – №6. – P. 87–91.
2. Andrianova E., Gumenuk A., Voronin D., Golubov I. Mineral Premix with L-Asparaginates of Microelements // Poultry industry. – 2011. – №3. – P. 16–19.
3. Shatskykh E.V. The productivity of broiler chickens using a prelaunch diet of organic forms of trace elements // Journal of Agricultural Urals. – 2008. – №11 (53). – P. 83–84.
4. Nikonov, I.N., Folmanis J.G., Folmanis G.E., Kovalenko L.V., Laptev, G.U., Egorov I.A., Fisinin V.I., Tananaev I.G. Nano-sized iron – a feed additive for poultry // Reports of the Academy of Sciences. – 2011. – V. 440. – №4. – P. 565–569.
5. Gen M.Ya., Miller A.V. USSR Certificate number 814432 // Bulletin of inventions. – 1981. – №11. – P. 25.
6. Zhigach A.N. Leipunsky I.O., Kuskov M.L., Stoenko N.I. Storozhev V.B. Plant for production and study of physical and chemical properties of metal nanoparticles // Instruments and Experimental Techniques. – 2000. – №6. – P.122–129.
7. Kolbin I.A., Kolesnikov O.L. Changing the parameters of the functional activity of neutrophilic granulocytes of peripheral blood donors after incubation with nanoparticles of silica // Bulletin of YuUrGU. – 2001. – №20. – P. 116–119.
8. Pavlov N.A., Nadezhdin S.V. reactions of white blood cells in the rat soluble and neravorimye form in experiments in vivo and in vitro // Scientific Statement of the Belgorod State University. Series: Natural Sciences. – 2010. – V. 21. – №13. – P. 103–106.
9. Vishnjakov A.I., Ushakov A.S., Lebedev S.V. Features of bone marrow blood when administered per os copper nanoparticles and intramuscularly // Bulletin of beef cattle – 2011. – V. 2. – №54. – P. 96–102.
10. Sizov E.A. The mineral composition and morphological and functional aspects of the reorganization of the liver in enteral route of administration of copper nanoparticles type CU10X // Bulletin of the Orenburg State University. – 2010. – №6 (112). – P. 92–94.
11. Skorkina M.Ju., Fedorova M.Z., Sladkova E.A., Derkachev R.V., Zabinyakov N.A. The effect of the iron nanoparticles on the blood oxygen capacity // Yaroslavl Pedagogical University. – 2010. – №2. – P. 101–106.