

УДК 577.27

Н. В. Головина, Н. В. Богачева, И. В. Дармов

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ

На современном этапе развития науки наночастицы коллоидного золота (НчКЗ) широко используют для разработки антибактериальных и противоопухолевых препаратов, а также для создания химических вакцин. Высокая востребованность НчКЗ в практической медицине обуславливает необходимость изучения их влияния на клетки макроорганизма.

Целью работы стало изучение влияния НчКЗ на функциональную активность макрофагов с помощью методики постановки МТТ-теста.

В качестве объекта исследования были выбраны перитонеальные макрофаги нелинейных мышей. Метаболическая активность макрофагов мыши была оценена в отношении трех серий препаратов НчКЗ с различным размером частиц. Оценку проводили методом постановки МТТ-теста. По результатам исследования была показана способность низких концентраций НчКЗ стимулировать функциональную активность макрофагов.

Ключевые слова: наночастицы коллоидного золота, функциональная активность макрофагов, МТТ-тест.

Наночастицы коллоидного золота (НчКЗ) – новый класс биомедицинских продуктов. Химическая инертность золота и его способность передавать полученную тепловую энергию в окружающую среду используются при создании новых технологий в области медицины, биотехнологии и генной инженерии.

На современном этапе развития науки НчКЗ используют для разработки антибактериальных и противоопухолевых препаратов, а также для создания нового поколения химических вакцин [1, 2, 3, 4].

На основе НчКЗ, конъюгированных с полисахаридами, разработаны гидрогели, обладающие антибактериальной активностью против Грам-отрицательных (*Pseudomonas aeruginosa*) и Грам-положительных (*Staphylococcus aureus*) микроорганизмов, а также против эукариотических клеточных линий HepG2 и MG63 [5].

Экспериментально доказана лечебно-профилактическая эффективность стоматологического геля, приготовленного с использованием НчКЗ размером 5 нм. Применение подобного геля при пародонтите способствует снижению дисбиоза полости рта и устраняет атрофию альвеолярного отростка челюсти, а при использовании в составе гемостатической губки для исправления костных дефектов способствует нормальному замещению дефекта соединительной тканью [6].

Разработаны методы лечения злокачественных опухолей с помощью введения в опухоль НчКЗ. Частицы благородного металла вследствие феномена поверхностного резонанса обладают расширенным видимым и инфракрасным световым поглощением, на несколько порядков более интенсивным по сравнению со стандартными лазерными агентами. Использование этого феномена позволило проводить выборочную и более эффективную противораковую терапию, называемую лазерным фототермолизом опухолей [7, 8].

По данным проведенных исследований НчКЗ оказывают стимулирующее влияние на иммунную систему организма. Способность НчКЗ повышать дыхательную активность клеток ретикулоэндотелиальной системы, митохондриальных ферментов макрофагов, пролиферативную активность Т-лимфоцитов, а также создавать длительный и напряженный иммунитет является преимуществом использования химических вакцин для иммунопрофилактики инфекционных заболеваний [9].

Одним из последних направлений использования НчКЗ стало применение их в качестве носителей, обеспечивающих адресную доставку лекарственных препаратов непосредственно в очаг заболевания [10].

Все вышесказанное свидетельствует о высокой востребованности НчКЗ в практической медицине и необходимости изучения их влияния, как и любых других потенциальных лекарственных препаратов, на клетки макроорганизма.

Цель данной работы – изучить влияние наночастиц коллоидного золота на функциональную активность макрофагов с помощью методики постановки МТТ-теста.

Материалы и методы

Для изучения влияния НчКЗ на функциональную активность макрофагов использовали метод постановки МТТ-теста.

В работе использовали следующие реагенты и оборудование: бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия («Sigma», США); среду RPMI 1640 («БиолоТ», Россия); среду Игла в модификации Дульбекко («Sigma», США); пептон («Био-тор», Россия); ФСБ («Биохим», Россия); 96% спирт (ГОСТ 5962-2013); хлороформ (ГОСТ 20015-88); стрептомицин («Биохимик», Россия); гепарин 5000 МЕ/мл («СинтезАКОМП», Россия); микроскоп «Микмед-2» («Ломо», Россия); микроскоп JEM-2100 («Jeol», Япония), ИФА-анализатор («MultiscanAscent», Финляндия); CO₂-инкубатор («Sanyo», Япония); центрифугу («ELMI», Латвия); камеру Горяева («Мини мед», Россия); весы электронные аналитические («OHAUS», США); 96-луночный полистироловые плоскодонные планшеты («Costar», Великобритания); стеклянную лабораторную посуду («АгатМед», Россия); одноканальные пипетки с переменным объемом на 10 мкл, 200 мкл и 1000 мкл («НТЛ», Польша); одноразовые пластиковые наконечники для автоматических пипеток («Omnitip», Польша); шприцы («Vogtmedical», Германия); пробирки типа Эппендорф («Eppendorf», Германия).

Перитониальные макрофаги получали от нелинейных мышей обоего пола с соблюдением требований этики при обращении с лабораторными животными. Оценку функциональной активности макрофагов проводили в отношении трех серий препаратов НчКЗ с размером частиц 15 нм (препарат № 1), 20 нм (препарат № 2) и 30 нм (препарат № 3).

Препараты НчКЗ оценивали методами спектрофотометрии и электронной микроскопии. По результатам электронной микроскопии все препараты были оценены как кондиционные – имели примерно одинаковый размер и форму, не образовывали конгломератов, имели одинаковую по интенсивности оптическую плотность.

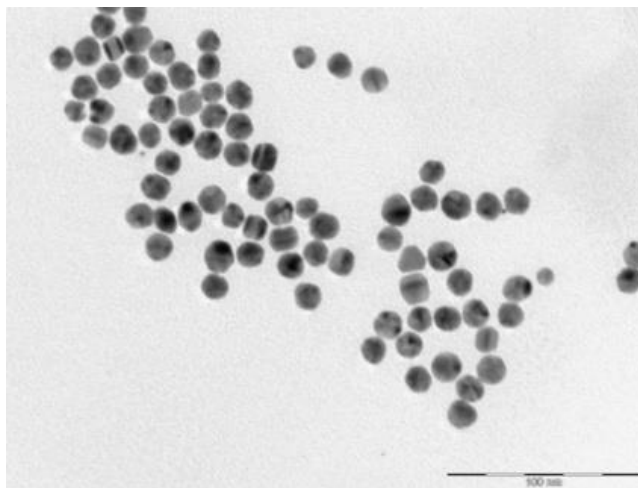


Рис. 1. Электронограмма наночастиц коллоидного золота, микроскоп JEM-2100 («Jeol», Япония)

Результаты и обсуждение

В основе метода МТТ лежит способность живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза, растворимые в диметилсульфоксиде (ДМСО). Уменьшение оптической плотности опытных проб по сравнению с контрольными, регистрируемое на ИФА-анализатор, должно быть статистически значимым для заключения о цитотоксическом действии вещества на клетки.

Постановку МТТ-теста проводили в соответствии с методикой [11]. В качестве объекта исследования в работе были использованы перитонеальные макрофаги.

Для получения перитонеальных макрофагов нелинейным мышам внутрибрюшинно вводили пептон в объеме 2 см³. Через 24 ч после введения пептона мышей умерщвляли при помощи хлороформа, после чего в паховую область вводили 5 см³ среды RPMI-1640. Брюшную полость массировали пинцетом в течение 5 мин, после чего при помощи пинцета и ножниц удаляли кожный покров с передней брюшной стенки. Используя одноразовый шприц, с соблюдением правил асептики и антисептики, проводили забор перитонеальной жидкости из бокового кармана брюшной полости. Отобранный объем перитонеальной жидкости помещали в пробирку и доводили объем содержимого пробирки до 10 см³ средой RPMI. Пробирку с содержимым центрифугировали при режиме 1000 об·мин⁻¹ в течение 5 мин при температуре 4 °С. Надосадочную жидкость удалили, а клеточную суспензию доводили RPMI- 1640 до первоначального объема. Пробирку с содержимым уравнивали и центрифугировали повторно при том же режиме. После центрифугирования осадок ресуспендировали в полной ростовой среде в объеме 1 см³.

Подсчет макрофагов проводили в 50 больших квадрантах камеры Горяева методом микроскопии. Концентрацию макрофагов рассчитывали по формуле (1).

$$A = B \cdot 10\,000, \quad (1)$$

где А – количество клеток крови в 1 см³,

В – количество клеток в 50 больших квадрантах камеры Горяева.

Для работы использовали макрофаги в концентрации $5 \cdot 10^6$ кл·см⁻³.

Полученную суспензию клеток с концентрацией $5 \cdot 10^6$ кл·см⁻³ вносили по 150 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного планшета и инкубировали в CO₂-

инкубаторе (содержание CO_2 –5 %, влажность–90-95 %, температура – 37 °С) в течение 24 ч.

По окончании инкубации среду с неприкрепленными клетками удаляли, лунки промывали раствором DPBS, вновь добавляли среду RPMI-1640 в объеме 150 мкл. После этого в лунки планшета вносили по 150 мкл препаратов НчКЗ № 1, 2, 3.

Каждый препарат вносили в концентрациях $1,0 \cdot 10^{10}$, $1,0 \cdot 10^{11}$, $1,0 \cdot 10^{12}$, $1,0 \cdot 10^{13}$, $1,0 \cdot 10^{14}$ частиц·см⁻³ в трех повторностях. В качестве отрицательного контроля использовали деионизированную воду, смешанную 1:1 со средой RPMI-1640. Схема постановки опыта представлена в таблице 2.

Таблица 2

Схема постановки МТТ-теста

№ препарата	Концентрация наночастиц*, частиц·см ⁻³					Контроль
1	$0,5 \cdot 10^{10}$	$0,5 \cdot 10^{11}$	$0,5 \cdot 10^{12}$	$0,5 \cdot 10^{13}$	$0,5 \cdot 10^{14}$	ДВ+ RPMI- 1640
	$0,5 \cdot 10^{10}$	$0,5 \cdot 10^{11}$	$0,5 \cdot 10^{12}$	$0,5 \cdot 10^{13}$	$0,5 \cdot 10^{14}$	То же
	$0,5 \cdot 10^{10}$	$0,5 \cdot 10^{11}$	$0,5 \cdot 10^{12}$	$0,5 \cdot 10^{13}$	$0,5 \cdot 10^{14}$	То же
2	$0,5 \cdot 10^{10}$	$0,5 \cdot 10^{11}$	$0,5 \cdot 10^{12}$	$0,5 \cdot 10^{13}$	$0,5 \cdot 10^{14}$	То же
	$0,5 \cdot 10^{10}$	$0,5 \cdot 10^{11}$	$0,5 \cdot 10^{12}$	$0,5 \cdot 10^{13}$	$0,5 \cdot 10^{14}$	То же
	$0,5 \cdot 10^{10}$	$0,5 \cdot 10^{11}$	$0,5 \cdot 10^{12}$	$0,5 \cdot 10^{13}$	$0,5 \cdot 10^{14}$	То же
3	$0,5 \cdot 10^{10}$	$0,5 \cdot 10^{11}$	$0,5 \cdot 10^{12}$	$0,5 \cdot 10^{13}$	$0,5 \cdot 10^{14}$	То же
	$0,5 \cdot 10^{10}$	$0,5 \cdot 10^{11}$	$0,5 \cdot 10^{12}$	$0,5 \cdot 10^{13}$	$0,5 \cdot 10^{14}$	То же
	$0,5 \cdot 10^{10}$	$0,5 \cdot 10^{11}$	$0,5 \cdot 10^{12}$	$0,5 \cdot 10^{13}$	$0,5 \cdot 10^{14}$	То же
Примечания: «ДВ» – деионизированная вода; «*» – указана конечная концентрация НчКЗ в лунках						

Содержимое планшета инкубировали в CO_2 -инкубаторе (содержание CO_2 –5 %, влажность–90-95 %, температура 37 °С) в течение 48 ч.

По окончании инкубации в каждую лунку планшета добавляли 10 мкл МТТ. Планшет ставили в CO_2 -инкубатор (содержание CO_2 –5%, влажность–90-95 %, температура 37 °С) на 1 ч.

По окончании инкубации из лунок планшета аккуратно удаляли содержимое и добавляли в каждую лунку по 150 мкл ДМСО. Планшет с содержимым инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Оценку результатов проводили на ИФА-анализаторе, используя длину волны 492 нм.

Зависимость оптической плотности содержимого лунок планшета (перитонеальных макрофагов, находящихся в ПРС) от размера и концентрации добавляемых НчКЗ представлена на рисунке 1.

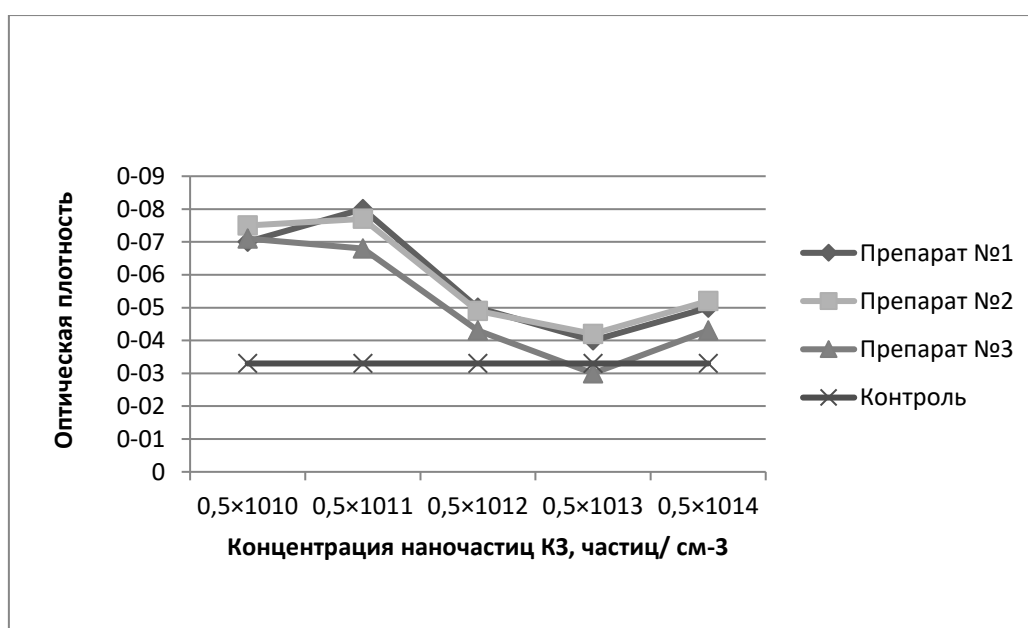


Рис. 2. Зависимость оптической плотности содержимого лунок планшета (перитонеальных макрофагов, находящихся в ПРС) от размера и концентрации добавляемых НчКЗ

Из данных, представленных на графике, следует, что НчКЗ не оказывают цитотоксическое влияние на перитонеальные макрофаги. Напротив, на фоне применения более низких концентраций препарата, независимо от размера наночастиц, наблюдается повышение метаболической активности макрофагов. Оптическая плотность раствора в лунках, где находились НчКЗ препаратов № 1, 2 и 3 в концентрациях $0,5 \cdot 10^{10}$ и $0,5 \cdot 10^{11}$ частиц·см⁻³, находилась в диапазоне 0,07-0,08 оптических единиц в противовес значениям оптической плотности контроля – 0,03-0,04 оптических единиц. Полученные данные могут

свидетельствовать о повышении функциональной активности макрофагов при добавлении к ним НчКЗ в низких концентрациях.

Вывод

По результатам работы методом постановки МТТ-теста установлено, что препараты наночастиц коллоидного золота нетоксичны, а при использовании в низких концентрациях способны стимулировать активность макрофагов. Полученные данные могут свидетельствовать о способности НчКЗ, при использовании их в качестве носителей, повышать эффективность медико-биологических препаратов за счет стимуляции неспецифического иммунитета.

Список литературы

1. *Praveen T.* Nanoparticle–Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising, Multi-Functional Materials // *Advanced Science*. 2012. № 2.
2. *Дыкман Л. А.* Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы // *Acta Naturae*. 2011. Т. 3. №. 2. С. 36–58.
3. *Меженный П. В.* Изучение иммуногенных свойств наночастиц селена и золота, конъюгированных с антигеном вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. № 1. С. 19–65.
4. *Смотрин С. М.* Антибактериальный и противогрибковый эффект бинта медицинского марлевого, содержащего наночастицы золота // *Медицинские новости*. 2011. № 6. С. 73–77.
5. Biological response of hydrogels embedding gold nanoparticles / E. Marsich [и др.] // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011. № 83. С. 331–339.
6. *Левицкий А. П.* Лечебно-профилактическое действие геля с нанозолотом при экспериментальном пародонтите / А. П. Левицкий, А. В. Борисенко, О. Б. Ткач // *Актуальные проблемы транспортной медицины*. 2014. № 3. С. 91–96.
7. *Tu R. S., Tirrell M.* Bottom-up design of biomimetic assemblies // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004. № 11. С. 1537–1563.
8. *Шляхто Е. В.* Инновационные нанотехнологии в медицине и биологии // *Инновации*. 2008. № 116. С. 54–59.
9. Изучение иммуногенных свойств наночастиц селена и золота, конъюгированных с антигеном вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней / П. В. Меженный [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. № 1. С. 10–13.

10. *Meeker D.* Could targeted, antibiotic-loaded gold nanoconstructs be a new magic bullet to fight infection // *Nanomedicine*. 2016. Т. 11. № 18. С. 2379–2382.

11. Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов: метод. указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. С. 123.

ГОЛОВИНА Нина Викторовна – бакалавр института биологии и биотехнологии, кафедра микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: nina.head@yandex.ru

БОГАЧЕВА Наталья Викторовна – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: bogacheva70@mail.ru

ДАРМОВ Илья Владимирович – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: gitikx@mail.ru