

## ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА МИКРОЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Яушева Е. В.<sup>1</sup>, Зелепухин А. Г.<sup>1</sup>, Рябов Н. И.<sup>1</sup>, Кван О. В.<sup>2</sup>, Раменский В. А.<sup>1</sup>,  
Заверюха А. Х.<sup>1</sup>, Сиразетдинов Ф. Х.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт мясного скотоводства Россельхозакадемии, Оренбург, Россия (460000, Оренбург, ул. 9 Января, 29), e-mail: vasilena56@mail.ru

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, Россия (460018, Оренбург, Пр. Победы, 13), e-mail: kwan111@yandex.ru

В работе изучено влияние наночастиц меди, железа и их агломератов на морфологические показатели крови и прирост живой массы лабораторных животных. Из полученных результатов следует, что независимо от формы и элемента внутримышечной инъекции наблюдалось увеличение интенсивности роста опытных животных. Так, через 7 дней после инъекции это выражалось в повышении прироста живой массы на 7,31 и 5,62 ( $P \leq 0,05$ ) % при введении наночастиц меди и железа, и на 3,61 и 2,98 ( $P \leq 0,05$ ) % при введении агломератов этих наночастиц. В течение эксперимента было отмечено повышение уровня таких показателей как: эритроциты, концентрация гемоглобина, среднее содержание гемоглобина в эритроците – в случае использования для инъекций лиозолей наночастиц и снижение значений данных показателей при использовании суспензий агломератов этих наночастиц. Наблюдалось развитие воспалительного процесса как через сутки, так и через 7 суток после инъекции, что проявлялось в достоверном повышении уровня лейкоцитов. В результате наблюдалась ярко выраженная ответная реакция организма на введение наночастиц металлов и агломератов их наночастиц в живой организм.

Ключевые слова: наночастицы металлов, агломераты, эритроциты, лейкоциты.

## STUDY OF METAL NANOPARTICLES AS A SOURCE OF MICRONUTRIENT FOR ANIMALS

Yausheva E. V.<sup>1</sup>, Zelepukhin A. G.<sup>1</sup>, Ryabov N. I.<sup>1</sup>, Kvan O. V.<sup>2</sup>, Ramenskii V. A.<sup>1</sup>,  
Zaveryukha A. H.<sup>1</sup>, Sirazetdinov F. H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Beef Cattle Production Russian Academy of Agricultural Sciences, Orenburg, Russia (460000, Orenburg, street 9 Yanvaryaya, 29), e-mail: vasilena56@mail.ru

<sup>2</sup>FSEE HEP «Orenburg State University», Orenburg, Russia (460018, Prospect of victory, 13), e-mail: kwan111@yandex.ru

In work studied the effect of nanoparticles of copper, iron, and their agglomerates on morphological parameters of blood and live weight gain in laboratory animals. These results suggest that, irrespective of the form of element and intramuscular injection, an increase in intensity of growth of experimental animals. So, 7 days after the injection is reflected in increased weight gain by 7.31 and 5.62 ( $p \leq 0,05$ ) % with the introduction of nanoparticles of copper and iron, and 3.61 and 2.98 ( $0 \leq P,05$ ) % with the introduction of agglomerates of nanoparticles. During the experiment, it was noted increase in indicators such as red blood cells, hemoglobin concentration, mean corpuscular hemoglobin in the case of injection of liozoley nanoparticles and decrease the values of these parameters when using suspensions of agglomerates of nanoparticles. Observed the development of the inflammatory process a day and 7 days after injection, which was manifested in a significant increase in the level of white blood cells. As a result, there was a pronounced response of the body to the introduction of metal nanoparticles and agglomerates of nanoparticles in a living organism.

Keywords: metal nanoparticles, agglomerates, erythrocytes, leukocytes.

### Введение

Обеспеченность эссенциальными элементами является одним из ключевых факторов нормализации работы организма сельскохозяйственных животных в различных условиях, особенно когда речь идет о спортивных достижениях и высокой продуктивности. В этой

связи очевидные перспективы имеют методы создания искусственных депо элементов в тканях тела через введение препаратов наночастиц металлов-микроэлементов.

Так, уже известно, что нанокристаллическое железо в биотических дозах ускоряет рост животных, усиливает регенерацию печени после частичной гепатэктомии, ускоряет заживление тканей. Показатели токсичности наночастиц селена, железа, меди и др. ( $d \approx 100$  нм) в МПД, ЛД<sub>50</sub>, ЛД 100 в десятки и сотни раз ниже в сравнении с минеральными солями этих металлов, а биодоступность наночастиц металлов микроэлементов, значительно превосходит соответствующий показатель для неорганических солей железа и органически связанных форм [1, 5, 6]. Однако, учитывая высокий потенциал наночастиц к агломерации, интерес представляет исследование не только биологической активности наночастиц, но и их агломератов.

В связи с этим целью работы являлась оценка влияния наночастиц различных металлов и их агломератов на организм животных.

#### **Материалы и методы исследований**

Исследования проводились на крысах-самцах линии Vistar ( $m = 150-180$  г), 3-х месячного возраста находящихся на общевиварийном рационе кормления. Лабораторным животным в рамках отдельных групп аналогов ( $n=6$ ) внутримышечно однократно вводили водные лиозолина ночастиц меди, железа; суспензии агломератов этих наночастиц размером от 900 до 1000 нм в дозе 2.0 мг/кг массы животного: 1 группе – наночастицы меди; 2 – наночастицы железа; 3 – агломераты наночастиц меди; 4 – агломераты наночастиц железа; 5 (контроль) – дистиллированную воду.

Кровь получали путем декапитации у предварительно наркотизированных животных через 1 и 7 суток после инъекции препаратов ( $n=3$ ). Экспериментальные исследования на животных проводили в соответствии с инструкциями, рекомендуемыми Российским Регламентом, (1987) и «The Guideforthe Careand Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D.C. 1996)».

В эксперименте использовались наночастицы меди ( $103 \pm 2$  нм) и железа ( $80 \pm 5$  нм) сферической формы, полученные методом высокотемпературной конденсации на установке «МиГен» [4] и предоставленные д-рм биол. наук Н. Н. Глущенко (Институтом энергетических проблем химической физики РАН, Москва). Размеры наночастиц меди и железа были определены с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM 7401F. Приготовление водных лиозолейнаночастиц проводили путем диспергирования ( $f - 35$  кГц,  $N - 300$  (450) Вт,  $A - 10$  мкм) точной навески порошка в течение 30 мин. Водные суспензии агломератов готовились аналогичным образом, время диспергирования составило 20 с.

Размеры агломератов были определены с использованием атомно-силовой микроскопии (атомно-силовой микроскоп SMM-2000).

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; гематокрит.

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

### Результаты исследования и их обсуждение

Оценка размерности наночастиц и агломератов АСМ позволила установить средние величины частиц по группам: 1–  $103 \pm 2$  нм; 2–  $80 \pm 5$  нм; 3–  $937 \pm 24,6$ ; 4 –  $923,7 \pm 29,6$ .

Полученные результаты свидетельствуют о неоднозначных изменениях морфологических показателей крови и прироста живой массы лабораторных животных в результате внутримышечного введения лиозолей наночастиц исследуемых металлов и суспензий агломератов этих наночастиц. Так, независимо от формы и элемента инъекции сопровождались повышением интенсивности роста опытных животных. В течение 7 дней это выражалось в повышении прироста живой массы в 1 группе на 7,31 ( $P \leq 0,05$ ) %, 2I– 5,62 ( $P \leq 0,05$ ) %, 3 – 3,61 ( $P \leq 0,05$ ) %, 4 – 2,98 ( $P \leq 0,05$ ) % относительно контроля.

Вероятно, что одной из косвенных причин этого действия стало увеличение содержания эритроцитов. Так, внутримышечное введение лиозолей наночастиц приводило к повышению содержания эритроцитов относительно контроля на 19,5 и 2,4 % в первой и второй группах спустя сутки, и на 5,3 и 9,5 % спустя 7 суток соответственно. Введение суспензий агломератов наночастиц сопровождалось снижением этого показателя на 12,3 и 14,5 % в 3 и 4 группе спустя сутки, и на 45,2 ( $P \leq 0,05$ ) и 14,1 % в 3 и 4 группах соответственно на 7 суток. Аналогичным образом изменялись значения концентрации гемоглобина и среднего содержания гемоглобина в эритроците (табл. 1).

Таблица 1. Отдельные морфологические и биохимические характеристики крови крыс-самцов линии Vistar при однократно введении в организм наночастиц меди и железа и их агломератов

Показатель	Группа	Время после инъекции, сут.	
		1	7
Эритроциты, $10^{12}/л$	1	$7,41 \pm 0,12$	$5,98 \pm 1,26$
	2	$6,35 \pm 0,3$	$6,22 \pm 0,58$
	3	$5,51 \pm 0,1$	$3,11 \pm 0,1$
	4	$5,37 \pm 0,3$	$4,88 \pm 1,9$

	5 (контроль)	6,2±0,09	5,68± 0,61
МНС <sup>1</sup> , пг	1	23,4± 0,17	22,57±3,88
	2	23,5±0,29	22,1±1,7
	3	19,40±0,03	19,70±0,1
	4	19,75±0,3	19,70±9,5
	5 (контроль)	20,4±0,7	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	99,3±23,5	107,3±3,28
	4	117,3±14,9	112,3±11,3
	5 (контроль)	145,5±10,5	133±2
Тромбоциты, 10 <sup>12</sup> /л	1	518,5±38,4	507,7±86,51
	2	504,5±145,2	533±4,04
	3	635±114,9	591,3±90,6
	4	590±76,8	599±172,2
	5 (контроль)	717±39	798,5±161,5
Гематокрит, %	1	33,1±0,20	25,9±3,49
	2	30,1±5,25	27,4±1,07
	3	26,8±0,66	20,1±0,64
	4	26,7±1,07	20,5±9,43
	5 (контроль)	27,9±8,16	23,3±3,56

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; <sup>1</sup>МНС – среднее содержание гемоглобина в 1 эритроците.

Наличие подобных изменений в содержании эритроцитов находит свое отражение в показателях гематокрита. Так, было отмечено повышение значений гематокрита на 5,2 и 2,2 % в первой и второй группах соответственно спустя сутки и на 2,6 и 4,1 % через 7 суток в этих же группах. В третьей и четвертой группах наблюдалось снижение значений гематокрита на 1–2 % спустя сутки и на 2–3 % спустя 7 суток соответственно относительно контроля. Следует отметить, что эффект наночастиц металлов по увеличению кислородной емкости крови был описан ранее. Так, в работе М. Ю. Скоркиной с соавтор. [7] констатировано, что однократное интрагастальное введение железоокисных наночастиц приводит к достоверному увеличению концентрации гемоглобина на 58,36 % ( $p \leq 0,05$ ) и кислородной емкости крови на 58,4 % ( $p \leq 0,05$ ).

Анализ количества тромбоцитов не выявил достоверных различий и показал снижение содержания тромбоцитов как спустя сутки так и через 7 суток во всех опытных группах.

Введение лиозолей наночастиц и суспензий агломератов исследуемых наночастиц привело к достоверному увеличению уровня лейкоцитов относительно контрольных значений на 39,2 ( $p \leq 0,05$ ) % в 1 группе, на 50 ( $p \leq 0,05$ ) % в третьей и четвертой группах спустя сутки, и через 7 суток в 2,5 раза в третьей группе и на 7,9 ( $p \leq 0,05$ ); 16,4 ( $p \leq 0,05$ ); 53,9 ( $p \leq 0,05$ ) % в первой, во второй и четвертой соответственно (табл. 2).

Таблица 2. Показатели количества лейкоцитов и их отдельных видов в крови крыс-самцов линии Vistar при однократно введении в организм наночастиц меди и железа и их агломератов

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	14,80±1,4*	19,4±5,04*
	4	14,70±0,6**	11,7±2,07
	5 (контроль)	9,76±0,409	7,6±3,371
Лимфоциты, $10^3 \text{ мм}^3$	1	10,6±0,01***	6,46±0,03***
	2	8,1±0,04***	7,05±0,02***
	3	11,70±0,01**	15,30±0,04***
	4	10,60±0,1	8,31±0,04***
	5 (контроль)	8±0,01	5,95±0,04
Гранулоциты, $10^3 \text{ мм}^3$	1	1,2±0,7	0,89±0,01
	2	0,9±0,001	0,95±0,01***
	3	1,38±0,1**	2,35±0,1***
	4	1,00±0,05	1,84±0,1***
	5 (контроль)	0,78±0,05	0,86±0,02
Моноциты, $10^3 \text{ мм}^3$	1	1,8±0,03***	0,85±0,002***
	2	1,±0,01***	0,9±0,01***
	3	1,60±0,02***	1,77±0,1***
	4	2,10±0,02***	1,55±0,1***
	5 (контроль)	0,84±0,02	0,79±0,01

Примечание: \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$ .

Содержание гранулоцитов было достоверно выше контрольных значений на 53,8 и 15,3 ( $p \leq 0,001$ ) в первой и второй группах, и на 76,9 и 28,2 ( $p \leq 0,001$ ) % – в третьей и четвертой группах соответственно через сутки; и на 3,5 и 10,5 ( $p \leq 0,001$ ) – в первой и второй группах, и в 2,7 и 2,1 ( $p \leq 0,001$ ) раза – в 3 и 4 группах соответственно через 7 суток.

Количество лимфоцитов достоверно увеличивалось относительно контроля во всех опытных группах, а именно: на 32,5 ( $p \leq 0,001$ ); 1,25 ( $p \leq 0,001$ ); 46 и 32,5 ( $p \leq 0,001$ ) % – в 1, 2, 3 и 4 группах соответственно спустя сутки, и на 7,6; 17,6; 39, 7 ( $p \leq 0,001$ ) % – в первой, второй, четвертой группах, и в 2,5 раза – в третьей группе через 7 суток.

Уровень моноцитов в 1, 3 и 4 группах достоверно ( $p \leq 0,001$ ) превышало контрольные значения в 1,9 и 2,5 раза, а во второй группе – на 19,1 ( $p \leq 0,001$ ) % спустя сутки, и на 7,6 ( $p \leq 0,001$ ) % – в первой, 13,9 ( $p \leq 0,001$ ) % – во второй, и практически – в 2 раза в 3 и 4 группах через 7 суток.

В процентном отношении отдельных видов лейкоцитов наблюдался сдвиг в сторону увеличения процента моноцитов на 1,2–4,5 % – в 1, 2 группах и 3–6 % – в 3, 4 группах и

гранулоцитов на 1,5–2,5 % – в 1, 2 группах и 2–10 % – в 3, 4 группах, и снижения процента лимфоцитов на 3–7 % – в 1, 2 группах и 6–13 % – в 3, 4 группах относительно контрольных значений спустя сутки, тогда как на 7 сутки, наоборот, наблюдалось незначительное увеличение количества лимфоцитов на 1,5–2 % в 1, 2 группах и 4–10 % в 3 и 4 группах и снижение количества моноцитов и гранулоцитов на 0,2–1 и 0,3–1 % – в 1, 2 группах, и на 2–3 и 3–9 % – в 3 и 4 группах соответственно.

В результате, мы наблюдали ярко выраженную ответную реакцию организма на введение как наночастиц металлов так и их агломератов.

Проводя сравнение данных по влиянию наночастиц и их агломератов на живой организм, можно отметить некоторые сходства и отличия. Так, при введении агломератов наночастиц металлов также как и при введении наночастиц этих металлов наблюдалось достоверное увеличение уровня лейкоцитов и их отдельных видов относительно контрольных значений через сутки, и повышение их количества через 7 суток после инъекции во всех опытных группах. При этом наиболее выраженную воспалительную реакцию в случае наночастиц спустя сутки вызывают инъекции меди, тогда как в случае агломератов воспалительная реакция практически одинакова. Сила реакции организма за тот же промежуток времени выше при введении агломератов наночастиц, на 12,3 (медь) и 49,2 (железо) %, чем при введении соответствующих наночастиц. Через 7 суток уровень лейкоцитов выше при введении агломератов наночастиц меди и наночастиц железа, при этом воспалительная реакция также протекает сильнее при введении агломератов наночастиц более чем в 3 раза. В результате отмечается развитие воспалительного процесса уже спустя сутки, сила которого через 7 суток снижается в случае наночастиц и увеличивается в случае агломератов этих наночастиц.

Однако ведение наночастиц используемых металлов в отличие от агломератов этих наночастиц не приводит к снижению таких показателей как эритроциты, концентрация гемоглобина, среднее содержание гемоглобина в 1 эритроците и гематокрит, а оказывает противоположный эффект.

При ведении лиозолей количество эритроцитов выше через сутки при введении наночастиц меди, на 19,1 % чем при введении наночастиц железа, а через 7 суток, наоборот, на 4,2 % при введении наночастиц железа по сравнению наночастицами меди. В случае использования для инъекций суспензий агломератов наночастиц содержание эритроцитов было ниже через сутки при введении агломератов наночастиц железа на 2,53 %, чем при введении агломератов наночастиц меди, а через 7 суток при введении агломератов наночастиц меди на 31,2 % по сравнению с агломератами наночастиц меди.

Концентрация гемоглобина через сутки при использовании агломератов была ниже после введения агломератов наночастиц меди, на 14,9 % ниже по сравнению с агломератами наночастиц железа, тогда как через 7 сут. величина данного показателя ниже при введении агломератов наночастиц меди, на 4,06 % ниже, чем при введении агломератов наночастиц железа. При использовании лиозолей наночастиц концентрация гемоглобина через сутки была выше после введения наночастиц меди, на 21,6 % по сравнению с наночастицами железа, а через 7 суток величина данного показателя, наоборот, выше при введении наночастиц железа на 6,8 %.

В отношении среднего содержания гемоглобина в 1 эритроците можно отметить, что его количество при использовании суспензий агломератов спустя сутки ниже при введении агломератов наночастиц меди, на 1,6 %, чем при использовании агломератов наночастиц железа, и не отличается между суспензиями агломератов через 7 суток. В случае использования для инъекций лиозолей наночастиц наблюдаются примерно одинаковые превышения по сравнению с контролем для обоих элементов.

Следует отметить, что данные эффекты описываются не впервые. Так, Вишняковым А. И. с соавтор. [3] получены данные, согласно которым использование наночастиц меди в составе основного кормового рациона для цыплят-бройлеров (1,7 мг/кг корма) приводит к достоверному увеличению содержания лейкоцитов на 39,63 % ( $p \leq 0,001$ ). Сведения, полученные Борисевич В. Б. с соавтор. [2], свидетельствуют об увеличении фагоцитарной активности лейкоцитарных клеток при использовании в качестве кормовой добавки для бройлеров смеси наноаквахелатов Ag, Cu, Zn, Mg, Co.

### **Заключение**

Таким образом, из полученных результатов следует, что внутримышечное введение наночастиц меди и железа и их агломератов приводит к воспалительной реакции и изменению уровня таких показателей как эритроциты, концентрация гемоглобина, среднее содержание гемоглобина в 1 эритроците, гематокрит и тромбоциты.

*Работа выполнена при поддержке Президента Российской Федерации, стипендия для молодых ученых и аспирантов (Конкурс СП-2012; СП-102.2012.4).*

### **Список литературы**

1. Богословская О. А. Изучение безопасности введения наночастиц меди с различными физико-химическими характеристиками в организм животных / О. А. Богословская, Е. А. Сизова, В. С. Полякова, С. А. Мирошников, И. Ю. Лейпунский, И. П. Ольховская, Н. Н.

- Глущенко // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – № 2. – С. 124–127.
2. Борисевич В. Б., Каплуненко В. Г. Наноматериалы и нанотехнологии в ветеринарной практике. – К.: ВД Авіцена, 2012. – 512 с.
  3. Вишняков А. И. Особенности костномозгового кроветворения при введении наночастиц меди *peros* и *intramuscularly* / А. И. Вишняков, А. С. Ушаков, С. В. Лебедев // Вестник мясного скотоводства. – 2011. – Т. 2. – № 54. – С. 96–102.
  4. Ген М. Я., Миллер А. В. Авторское свидетельство СССР № 814432. Бюллетень изобретений. – 1981. – № 11. – С. 25.
  5. Глущенко Н. Н. Физико-химические закономерности биологического действия высокодисперсных порошков металлов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.02 / Н. Н. Глущенко. – М., 1988. – 50 с.
  6. Мирошников С. А. Влияние перорального приема препарата *Bifidobacterium longum* на величину эндогенных потерь ионов тяжелых металлов / С. А. Мирошников, О. В. Кван, Д. Г. Дерябин, С. В. Нотова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2005. – № 2. – С. 44–46.
  7. Скоркина М. Ю. Влияние наночастиц железа на дыхательную функцию крови / М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, Е. А. Сладкова, Р. В. Деркачев, Н. А. Забиняков // Ярославский педагогический университет. – 2010. – № 2. – С. 101–106.

#### **Рецензенты:**

Лебедев Святослав Валерьевич, д-р биол. наук, зав. с.-х. лаб. института биоэлементологии ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный университет», г. Оренбург.

Ранделин Александр Васильевич, д-р с.-х. наук, профессор, заместитель директора по научной работе ГНУ Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции Россельхозакадемии, г. Волгоград.