

РЕАКЦИЯ БРЮШИНЫ МЫШЕЙ ПРИ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ДЕТОНАЦИОННЫХ НАНОАЛМАЗОВ

Жуков Е.Л.¹, Инжеваткин Е.В.^{1,2}, Медведева Н.Н.¹

¹ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия (660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1), e-mail: evgen_patolog@mail.ru

²ФГБУН «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии Наук», Красноярск, Россия (660036, Красноярск, ул. Академгородок, 50)

Исследовано влияние детонационных наноалмазов на брюшину мышей. Экспериментальным животным, разделенным на группы, в полость брюшины вводили по 1 мл деионизированной воды или стерильного гидрозоль наноалмазов с концентрацией 20мкг/мл. Через трое суток после инъекции животных выводили из эксперимента и оценивали активацию перитонеальных макрофагов по степени выраженности блеббинга плазмолеммы и толщину листков брюшины. Полученные данные сравнивали с аналогичными показателями интактных животных. Установлено, что наноалмазы введенные в полость брюшины, вызывают активацию перитонеальных макрофагов, проявляющуюся в увеличении индекса блеббинга; утолщение париетального и висцерального листков брюшины. Показано, что деионизированная вода, используемая в качестве дисперсионной среды при приготовлении гидрозоля наноалмазов, также вызывает увеличение индекса блеббинга и утолщение обоих листков брюшины, но в меньше степени.

Ключевые слова: наноалмаз, гидрозоль наноалмазов, блеббинг плазмолеммы, перитонеальные макрофаги, брюшина.

THE REACTION OF THE PERITONEUM OF MICE AT INTRAPERITONEAL INJECTION OF DETONATION NANODIAMONDS

Zhukov E.L.¹, Inzhevatkin E.V.^{1,2}, Medvedeva N.N.¹

¹Krasnoyarsk State Medical university of the prof. V. F. Voyno-Yasenevsky, Krasnoyarsk, Russia (660022, Krasnoyarsk, street Partizan Zheleznyak, 1), e-mail: evgen_patolog@mail.ru

²Krasnoyarsk scientific center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia (660036, Krasnoyarsk, street Akademgorodok, 50)

In this study, we examined the effect of detonation nanodiamonds in the peritoneum of mice. In peritoneal cavity of mice injected 1 ml of sterile water suspension of nanodiamonds in deionized water with concentration 20mg / ml. For comparative analysis, in peritoneal cavity of control mice, was injected 1 ml of deionized water. Three days after injection, animals were withdrawn from the experiment and examined activation of peritoneal macrophages on degrees of expressiveness of a blebbing of plasmalemma and thickness layers of peritoneum. The obtained data were compared with those of intact animals. It was found that nanodiamonds introduced into the peritoneal cavity, causing the activation of peritoneal macrophages, manifested in the increase of the blebbing; thickening of the parietal and visceral layers of the peritoneum. It is shown that the deionized water for suspension of nanodiamonds also causes an increase in the blebbing and thickening both layers of the peritoneum, but to a lesser extent.

Keywords: nanodiamond, hydrosol of nanodiamonds, blebbing of plasmalemma, peritoneal macrophages, peritoneum.

Развитие современных технологий в биомедицинских науках значительно расширяет методологические возможности ученого в совершенствовании и углублении знаний об этиологии, патогенезе и лечении различных заболеваний. Большой интерес представляет применение продуктов нанотехнологического прогресса для диагностики и лечения патологических процессов, в частности речь идет о наноалмазах детонационного синтеза [10]. Данные наночастицы имеют алмазное ядро из углерода, размером 4-5нм, покрытое снаружи различными химически активными группами. Небольшие размеры частиц и

высокая химическая активность поверхности обеспечивают этому наноматериалу высокую сорбционную емкость – 1 грамм наноалмазов может сорбировать на себя до 0,5 граммов белка. Таким образом, наноалмазы можно использовать как сорбент при различных патологиях, требующих высокий уровень связывания и выведения различных нежелательных для организма веществ, в том числе и органической природы. Можно предполагать, что наноалмазы найдут свое применение как носитель лекарственных средств, энтеросорбент, раневое покрытие для инфицированных ран, для лечения гнойных перитонитов и т.п.[5,6]. Предварительные исследования показали, что наноалмазы обладают высокой биологической совместимостью [9].

Целью исследования было выявить реакцию организма экспериментальных животных на интраперитонеальное введение гидрозолей наноалмазов.

Материалы и методы исследования

В работе использовали наноалмазы, полученные в НПО «Алтай» (г. Бийск). Но данный наноматериал обладал существенным недостатком, общим для подавляющего большинства используемых наноалмазов – низкой коллоидной устойчивостью, что не позволяло получить устойчивый гидрозоль наночастиц, который можно было бы простерилизовать для инъекционного введения в полость брюшины без ухудшения качества гидрозоля. Поэтому проводили дополнительную очистку поверхности наночастиц по запатентованной методике [7,8]. В результате получали наноалмазы, которые способны образовывать устойчивые гидрозоли, и невыпадающие в осадок даже после стерилизации.

В работе использовали гидрозоль наноалмазов концентрации 0,002 вес.%, который получали простым добавлением деионизованной воды к навеске порошка наноалмазов. Затем гидрозоль разливали в чистую стеклянную тару, герметично укупоривали резиновой пробкой с алюминиевой обкаткой и стерилизовали в автоклаве.

В качестве экспериментальных животных использовали инбредных белых лабораторных мышей весом 26-28 грамм, самцов.

Животных случайным образом распределили на 3 группы:

1 группа – 11 животных – вводили 0,002 вес.% гидрозоль наноалмазов в полость брюшины.

2 группа – 10 животных – вводили деионизованную воду в полость брюшины.

3 группа – 10 животных – в полость брюшины ничего не вводили (контрольная группа).

Работу с экспериментальными животными осуществляли в виварии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого с соблюдением требований гуманного обращения с экспериментальными животными согласно

«Руководству по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях» [2] после разрешения Локального Этического комитета ГОУ ВПО КрасГМУ им. проф. Ф.В. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ (протокол № 26/2010 от 24.09.2010г).

Животных наркотизировали эфиром, обрабатывали переднюю брюшную стенку 70-градусным этиловым спиртом, и инсулиновым шприцем в полость брюшины вводили 1 мл гидрозоля наноалмазов или деионизованной воды, согласно распределению животных по группам. После пробуждения отсаживали животное в клетку. Через 72 часа после инъекции животное выводили из эксперимента путем дислокации позвоночника в шейном отделе. В полость брюшины вводили 5 мл раствора Хенкса, после чего массируют животному живот в течение 2 минут. После массажа откачивали с помощью шприца содержимое полости брюшины, из которого выделяли перитонеальные макрофаги, основываясь на их быстрой адгезии к стенкам культурального сосуда [3].

Клеточную суспензию с макрофагами наносили на обезжиренное предметное стекло, покрывали покровным стеклом и микроскопировали на микроскопе Nikon Eclipse Ni-U с насадкой для фазового контраста (увеличение x1000, масляная иммерсия). При микроскопии оценивали состояние плазмолеммы макрофагов, по морфологии которой выделяли 4 вида клеток и подсчитывали их количество: интактные макрофаги, макрофаги в состоянии начального блеббинга, макрофаги в состоянии терминального блеббинга, некротизированные макрофаги. Производили подсчет клеток в нескольких полях зрения (не менее 100 клеток от каждого животного). Полученные данные заносили в протокол исследования в формате электронной таблицы Excel, вычисляли процентное соотношение клеток по 4 видам для каждого животного. Также мы вычисляли индекс блеббинга макрофагов – выраженное в процентах отношение макрофагов в состоянии терминального блеббинга к количеству макрофагов в состоянии начального и терминального блеббинга.

Кроме этого, были взяты фрагменты тонкой кишки и передней брюшной стенки для исследования висцеральной и париетальной брюшины. Образцы органов фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 24 часов, затем пропитывали парафином в автоматизированном гистологическом процессоре Leica TP1020, заливали в парафиновые блоки, и изготавливали парафиновые срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по методу Ван Гизон по стандартным протоколам [4]. Полученные гистологические препараты подвергали обзорной микроскопии на микроскопе Nikon Eclipse Ni-U с системой фото-видеодокументации Nikon DS-Fi2 и морфометрии с помощью программы JMicroVision 1.2.7. В препаратах измеряли толщину париетальной (передняя брюшная стенка) и висцеральной брюшины (тонкая кишка) в 5 полях зрения от каждого животного, не менее 5 измерений в каждом поле зрения.

Для численного представления полученных параметров использовали медиану и квартили Me [Q1;Q3], сравнение проводили с помощью непараметрических методов статистики [1]. Так как было больше двух групп сравнения, то сначала мы использовали дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis), который показал наличие различий показателей между группами. Далее для попарного сравнения использовали критерий Манна-Уитни (U-test) с поправкой Холма. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании состояния перитонеальных макрофагов экспериментальных животных при интраперитонеальном введении гидрозолей наноалмазов был выявлено, что количество интактных клеток статистически значимо больше, чем некротизированных и клеток в состоянии блеббинга разной степени выраженности ($p < 0,01$). Количество некротизированных клеток статистически значимо меньше, чем интактных и в состоянии блеббинга различной степени выраженности ($p < 0,01$). Статистически значимых различий между количеством клеток в состоянии начального и терминального блеббинга не выявлено ($p = 0,97$) (табл. 1).

Таблица 1

Соотношение перитонеальных макрофагов в различной степени блеббинга, в %
(Me[Q1;Q3])

Состояние плазмолеммы перитонеальных макрофагов	Группа животных		
	Введение 1мл 0,002 вес.% гидрозоль наноалмазов	Введение 1мл деионизованной воды	Контрольные (интактные) животные
Интактные макрофаги	37,50[34,23;45,58]	63,83[58,47;66,06] $p^1=0,0001$	68,64[66,67;72,73] $p^1=0,0001$ $p^2=0,006$
Начальный блеббинг	25,16[20,69;26,00]	24,32[20,91;27,18] $p^1=0,97$	21,68[16,83;24,51] $p^1=0,14$ $p^2=0,15$
Терминальный блеббинг	24,32[19,00;27,67]	8,87[7,77;10,62] $p^1=0,0003$	5,79[4,59;8,91] $p^1=0,0002$ $p^2=0,02$
Некротизированные макрофаги	10,60[6,00;14,00]	4,61[3,54;5,74] $p^1=0,002$	2,86[2,44;3,92] $p^1=0,0001$ $p^2=0,03$
Индекс блеббинга	46,77[42,22;56,10]	28,02[25,81;30,00] $p^1=0,0006$	21,36[19,23;27,59] $p^1=0,0003$ $p^2=0,04$

Примечание: p^1 – уровень значимости «р» при сравнении с группой животных, которым вводили гидрозоль наноалмазов. p^2 – уровень значимости «р» при сравнении с группой животных, которым вводили деионизованную воду.

После введения деионизованной воды в полости брюшины экспериментальных животных интактных макрофагов наблюдается статистически значимо больше ($p < 0,01$), а клеток в состоянии некроза статистически значимо меньше ($p < 0,01$). При этом клеток в состоянии начального блеббинга больше, чем в состоянии терминального ($p < 0,01$) (табл. 1).

У животных контрольной группы, которым в полость брюшины ничего не вводили, количество интактных клеток статистически значимо больше, чем клеток в состоянии блеббинга и некротизированных ($p < 0,01$). Некротизированных клеток наименьшее количество ($p < 0,01$). Макрофагов в состоянии начального блеббинга больше, чем в состоянии терминального ($p < 0,01$) (табл. 1).

При сравнении видов клеток у разных групп животных отмечается, что интактных макрофагов статистически значимо больше в контрольной группе животных, в группе животных, которым вводили гидрозоли наноалмазов интактных клеток наименьшее количество (табл. 1).

Количество перитонеальных макрофагов в состоянии начального блеббинга не имело статистически значимых различий у животных всех групп (табл. 1).

Перитонеальные макрофаги в состоянии терминального блеббинга в наибольшем количестве определяются в группе животных, которым вводили гидрозоль наноалмазов в полость брюшины. Наименьшее количество макрофагов в состоянии терминального блеббинга наблюдается в контрольной группе животных (табл. 1).

Некротизированные макрофаги также в наибольшем количестве выявлены в группе животных, которым интраперитонеально вводили наночастицы. В контрольной группе некротизированные макрофаги встречаются редко (табл. 1).

При расчете индекса блеббинга было установлено, что статистически значимое наибольшее значение этого показателя наблюдается при введении экспериментальным животным гидрозоля наноалмазов, наименьшее – у животных контрольной группы (табл. 1).

При микроскопии брюшины животных, которым вводили гидрозоль наноалмазов, отмечается отек соединительнотканной пластинки, мезотелия. Отдельные клетки мезотелия изменили плоскую форму на кубическую. В соединительнотканной пластинке наблюдается большое количество макрофагов с примесью лимфоцитов. У животных, которым в полость брюшины вводили деионизованную воду, реакция брюшины менее выражена: наблюдается слабовыраженный отек брюшины, отечный мезотелий встречается на небольшом

протяжении, в соединительнотканной пластинке макрофаги и лимфоциты встречаются в единичном количестве.

При сравнении толщины брюшины отмечается статистически значимое увеличение как висцеральной, так и париетальной брюшины у животных, которым вводили гидрозоль наноалмазов (табл. 2).

Таблица 2

Толщина париетальной и висцеральной брюшины, в мкм (Me[Q1;Q3])

Толщина брюшины (мкм)	Группа животных		
	Введение 1мл 0,002 вес.% гидрозоля наноалмазов	Введение 1мл деионизованной воды	Контрольные (интактные) животные
Париетальная брюшина	12,37[8,32;15,71]	8,59[6,37;11,31] $p^1 < 0,01$	5,56[4,56;7,39] $p^1 = 0,00$ $p^2 < 0,01$
Висцеральная брюшина	3,92[3,11;5,06]	3,15[2,70;3,88] $p^1 < 0,01$	1,86[1,51;2,25] $p^1 = 0,00$ $p^2 = 0,00$

Примечание: p^1 – уровень значимости «р» при сравнении с группой животных, которым вводили гидрозоль наноалмазов. p^2 – уровень значимости «р» при сравнении с группой животных, которым вводили деионизованную воду.

Введение деионизованной воды также вызывает статистически значимое утолщение париетальной и висцеральной брюшины, но в гораздо меньшей степени, чем при введении наночастиц (табл.2).

Заключение

Обобщая полученные нами данные, можно сделать заключение о том, что, несмотря на высокую биологическую совместимость наноалмазов детонационного синтеза, введение данных наночастиц в виде стерильного гидрозоля концентрации 0,002 вес.% вызывает реакцию со стороны брюшины, проявляющуюся в виде её отека, инфильтрации клетками макрофагального и лимфоидного ряда, увеличению содержания перитонеальных макрофагов в состоянии терминального блеббинга и некроза в экссудате из полости брюшины. Увеличение процентного содержания перитонеальных макрофагов в состоянии терминального блеббинга и некроза происходит за счет уменьшения доли интактных клеток в выделенной клеточной популяции, в связи с чем происходит увеличение индекса блеббинга. Кроме этого, аналогичные реактивные изменения со стороны брюшины мы обнаружили и при введении в ее полость деионизованной воды, хотя и в гораздо меньшей степени. Следовательно, вполне закономерным является предположение, что реакция организма экспериментальных животных на введение гидрозоля наноалмазов в

концентрации 0,002 вес.% складывается из двух факторов – наличия наночастиц и крайне низкого осмотического давления дисперсионной среды (деионизованной воды). Таким образом, для уменьшения влияния золь нанодиамазов детонационного синтеза на серозную оболочку брюшной полости и активацию перитонеальных макрофагов можно рекомендовать вводить интраперитонеально данные наночастицы в дисперсионной среде, имеющей осмотическое давление, приближенное к физиологическим показателям.

Авторы выражают искреннюю признательность и благодарность за помощь в проведении исследования заведующей кафедрой биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ, д.м.н., проф. Салминой Алле Борисовне и профессору кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ, д.м.н., Малиновской Натальи Александровне; за предоставление стерильных гидрозоль нанодиамазов детонационного синтеза заведующему лабораторией нанобиотехнологии и биолюминесценции ИБФ КНЦ СО РАН (г.Красноярск), д.б.н. Бондарю Владимиру Станиславовичу, старшему научному сотруднику лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции ИБФ КНЦ СО РАН (г.Красноярск) Пузырю Алексею Петровичу.

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – 460с.
2. Каркищенко, Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. – М.: Медицина, 2010. – 344с.
3. Клаус Д. Лимфоциты. Методы: пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 395с.
4. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. – СПб: Спецлит, 2010. – 95с.
5. Лазаренко Л.И., Жуков Е.Л., Кругом С.В. и др. Эффект действия детонационных нанодиамазов на здоровые ткани пародонта экспериментальных животных и при их воспалительно-деструктивных изменениях // Сибирское медицинское обозрение. – 2008. – №6(54). – С.27-31.
6. Медведева Н.Н. Жуков Е.Л., Инжеваткин Е.В. и др. Изучение противоопухолевых свойств модифицированных нанодиамазов детонационного синтеза и сорбированного на них доксорубина на примере асцитной карциномы Эрлиха // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – №15. – С.360-363.
7. Пузырь А.П., Бондарь В.С. Способ обработки нанодиамазов//Патент России №2258671 С2. 2005. Бюл. № 23.
8. Пузырь А.П., Бондарь В.С. Способ получения нанодиамазов взрывного синтеза с повышенной коллоидной устойчивостью // Патент России №2252192 С2. 2005. Бюл. № 14.
9. Пузырь А.П., Бондарь В.С., Селимханова З.Ю. и др. Динамика некоторых физиологических показателей лабораторных мышей при длительном пероральном введении гидрозоль нанодиамазов // Сибирское медицинское обозрение. – 2004. – № 4(33). – С.19-23.

10. Ishchenko L.A., Stolyar S.V., Inzhevatkin E.V. et al. Magnetic properties and application of biomineral particles produced by bacterial culture // В сборнике: Physics Procedia 12th International Conference on Magnetic Fluids, ICMF12. Сер. "12th International Conference on Magnetic Fluids, ICMF12" Sendai, 2010. – P. 279-282.

Рецензенты:

Али-Риза А.Э., д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии им. проф. П.Г. Подзолкова с курсом ПО ГБОУ ВПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск;

Савченко А.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера», г. Красноярск.