

О.Б. Белова
Ю.Д. Винничук
Н.М. Бережная

Институт экспериментальной
патологии, онкологии
и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев,
Украина

Ключевые слова: наночастицы,
ферромагнетик, лимфоциты,
макрофаги, моноциты,
нейтрофилы, фагоцитоз,
бласттрансформация.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА ИНТАКТНЫХ МЫШЕЙ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С НАНОЧАСТИЦАМИ ФЕРРОМАГНЕТИКА В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Резюме. Изучено влияние ферромагнетика (Fe_3O_4 , размер частиц — 40–60 нм, стабилизированный полидекстраном) на функциональную активность клеток лимфоцитов лимфатических узлов, перитонеальных макрофагов, моноцитов и нейтрофилов периферической крови мышей линии Balb/c при непосредственном взаимодействии в системах *in vitro* и *in vivo*. Показано, что влияние наночастиц ферромагнетика дозозависимо. Изменения имели разнонаправленный характер, что проявлялось угнетением пролиферативного ответа лимфоцитов при введении наночастиц *in vivo* и некоторой стимуляцией в системе *in vitro*. *In vitro* отмечали усиление фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов; моноцитов и нейтрофилов крови; *in vivo* (в зависимости от условий) активность фагоцитов как стимулировалась, так и подавлялась.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время интенсивно проводятся исследования, направленные на применение нанотехнологий в различных областях медицины, что способствует активному расширению как круга наночастиц, так и подходов к их использованию в диагностике и терапии, в частности, для разработки систем доставки лекарственных веществ к органам и тканям-мишеням. Использование различных наночастиц находит все большее применение и в лечении больных с онкологическими заболеваниями. Наряду с этим, высокая проникающая способность наночастиц вызывает ряд опасений в связи с их возможным влиянием на различные клетки и системы здорового организма, в том числе системы иммунитета. Нельзя исключить возможность нарушения функционирования последней под влиянием наночастиц, что определяет необходимость изучения такого влияния на функциональную активность различных иммунокомпетентных клеток. Этот вопрос стал предметом исследований лишь в последние годы и поэтому количество опубликованных данных сравнительно невелико. Особое внимание привлекают исследования, авторы которых, отмечая преимущества нанотехнологий, указывают на способность наночастиц вызывать некоторые негативные эффекты [1–3]. Так, в исследованиях *in vitro* и *in vivo* было показано, что наночастицы активируют продукцию провоспалительных цитокинов, хемокинов, экспрессию молекул адгезии; стимулируют клетки воспаления, включая базофилы, нейтрофилы и эозинофилы, макрофаги, а также дендритные клетки, Т-лимфоциты. Эти изменения могут влиять на баланс

Th_1/Th_2 -лимфоцитов, что приводит к созданию условий для развития аллергии, аутоиммунных и неопластических заболеваний [3, 4]. При изучении влияния на иммунную систему человека наночастиц двуокиси титана также отмечено повышение уровня провоспалительных цитокинов, усиление процесса созревания дендритных клеток и активация пролиферации «наивных» $CD4^+$ Т-клеток [5]. Появились сообщения о влиянии наночастиц коллоидного золота на тучные клетки в зависимости от времени экспозиции: более длительное взаимодействие наночастиц с этими клетками приводит к увеличению объема их первичных гранул и снижению секреции серотонина без влияния на жизнеспособность [6]. Рядом авторов отмечено негативное действие карбоновых нанотрубок на клетки системы иммунитета. Так, при изучении эффектов некоторых видов нанотрубок на систему дыхания мышей выявлены небольшие повреждения в легких, которые сочетаются с угнетением функции Т-лимфоцитов без изменения их количества [7, 15]. Показано также, что многослойные карбоновые трубки вызывают аллергический ответ у мышей посредством активации В-лимфоцитов и повышения продукции IgE; отмечено и дозозависимое увеличение продукции провоспалительных цитокинов [8].

Нашло отражение в литературе и воздействие на иммунитет наночастиц ферромагнетиков (ФМ). Так, при изучении эффектов частиц магнетита (Fe_3O_4) нано- и микрометрового диапазона при интратрахеальном введении установлено, что при равных массовых дозах наночастицы обладают значительно более выраженной биологической активностью, чем частицы микрометрового диапазона,

вызывают повышение фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов [9]. Исследование *in vivo* действия наночастиц Fe_3O_4 показало дозозависимое изменение продукции цитокинов у мышей ICR: увеличение уровня IL-2, IFN γ и IL-10 в периферической крови; уровень IL-4 не изменялся [10, 11].

Несмотря на активизацию исследований влияния различных наночастиц на систему иммунитета здорового организма, остается много неясных вопросов. В частности, отмечается недостаток данных о характере влияния наночастиц ФМ на функции таких центральных клеток системы иммунитета, как лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение воздействия наночастиц ФМ на функциональную активность лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, нейтрофилов интактных мышей в исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние наночастиц ФМ (Fe_3O_4 , 40–60 нм, стабилизированный полидекстраном) [12] изучали в различных условиях: при воздействии на клетки системы иммунитета *in vitro* и *in vivo* (после введения наночастиц в организм).

Работа проведена на материале, полученном от интактных мышей линии BALB/c: лимфоциты подмышечных и паховых лимфатических узлов, нейтрофильные лейкоциты и моноциты перитонеальной крови, макрофаги перитонеального экссудата.

Пролиферативную активность лимфоцитов под действием Т- (РНА; 20 мкг/мл) и В-клеточного (PWM; 2,5 мкг/мл) (Sigma, USA) митогенов изучали в реакции бласттрансформации (РБТЛ) [13] с использованием проточного цитофлуориметра FACSscan (Becton Dickinson, США), оборудованного арговым лазером с длиной волны 488 нм. Для оценки долевого содержания клеток в основных фазах митотического цикла (G0/G1, S, G2/M) гистограммы распределения обрабатывали с помощью специализированной математической программы Mod Fit LT 2.0 (BDIS, США). Уровень пролиферативной активности лимфоцитов оценивали по количеству клеток пролиферирующей фракции (клетки в S-, G2- и M-фазах клеточного цикла) [14].

Функциональную активность фагоцитирующих клеток (нейтрофилы, моноциты, макрофаги) оценивали по стандартной методике *in vitro* с использованием *St. aureus* (подсчитывали процент фагоцитирующих клеток и микробное число).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведение исследований прежде всего поставило перед необходимостью определить дозу и время сочетанного культивирования наночастиц для выяснения характера их непосредственного влияния на клетки. С этой целью была проведена серия экспериментов с различными дозами (12,5; 6,0; 3,0; 1,5; 0,75 и 0,4%) ФМ и временем культивирова-

ния (2; 24 и 48 ч). Было установлено, что указанные дозы ФМ существенно не влияли на жизнеспособность клеток при 2-часовом культивировании, однако при культивировании на протяжении 24 и 48 ч отмечено негативное влияние. Поэтому в дальнейших исследованиях использовали две дозы — 3,0 и 1,5%, которые практически не влияли на количество живых клеток.

Исследования в системе *in vitro* проводили в следующих условиях: 1) предварительная обработка ФМ клеток с последующим изучением реакции фагоцитоза и РБТЛ; 2) сочетанное культивирование без предварительной обработки. При изучении пролиферативной активности лимфоцитов отмечено повышение спонтанной бласттрансформации клеток при всех условиях культивирования (при предварительном культивировании эффект был дозозависимым); достоверное повышение (независимо от варианта воздействия) РНА-индуцированного ответа под влиянием ФМ в дозе 3,0%; отсутствие эффекта на индуцированный ответ В-лимфоцитов за исключением серии опытов с предварительным культивированием клеток с дозой наночастиц 3,0%, в которой отмечали достоверное угнетение пролиферативного ответа (рис. 1).

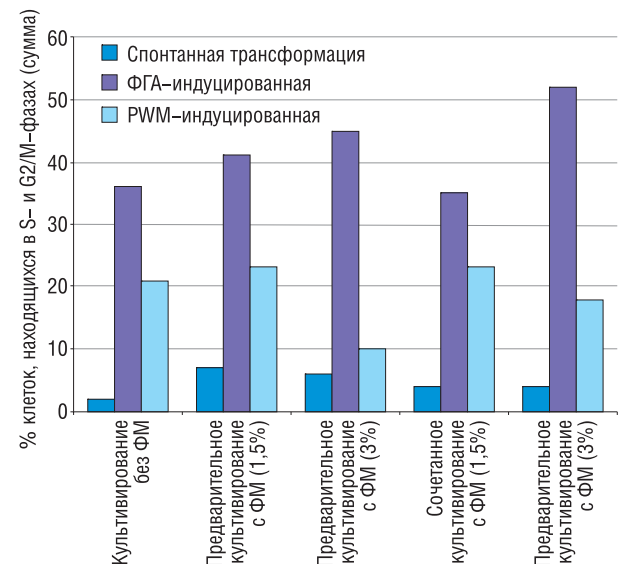


Рис. 1. Влияние наночастиц ФМ на РБТЛ в различных условиях сокультивирования

Изучение действия ФМ на фагоцитарную активность макрофагов перитонеального экссудата показало, что при сочетанном культивировании с ФМ в дозе 1,5% их активность достоверно повышалась (увеличение микробного числа при высоком проценте фагоцитирующих клеток); при воздействии дозы 3,0% показатели не отличались от контрольных. Отмечено дозозависимое повышение фагоцитарной активности нейтрофилов. Активность моноцитов крови не изменялась при действии дозы 1,5% и достоверно снижалась под влиянием 3,0% ФМ (рис. 2). В условиях предварительной обработки клеток ФМ достоверных различий в фагоцитарной активности не выявлено.

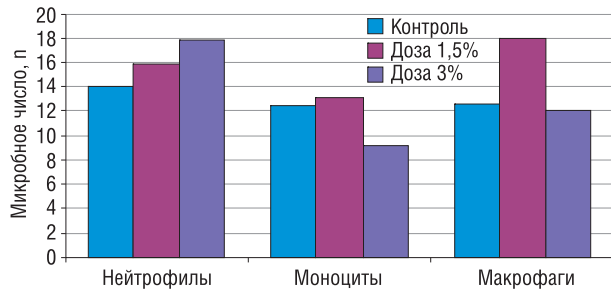


Рис. 2. Влияние наночастиц ФМ на активность (микробное число) фагоцитирующих клеток в условиях сочетанного культивирования

Таким образом, установлено, что наночастицы ФМ в зависимости от дозы и схемы культивирования *in vitro* по-разному влияют на функциональную активность различных клеток системы иммунитета: доза 1,5% повышает активность перитонеальных макрофагов, но не влияет на таковую моноцитов крови; доза 3% угнетает активность моноцитов крови и не изменяет активность макрофагов; обе дозы повышают фагоцитарную активность нейтрофилов, а также спонтанную пролиферацию лимфоцитов и РНА-индуцированный ответ Т-лимфоцитов в условия предварительного (до внесения митогенов) воздействия. При предварительном воздействии доза ФМ 1,5% не влияет на РWM-индуцированный ответ В-лимфоцитов, 3,0% — угнетает его; при сочетанном культивировании ни одна из доз ФМ не оказывает достоверного влияния.

Для изучения влияния ФМ *in vivo* его вводили в хвостовую вену в дозах: 3; 9; 30 и 300 мг/кг, активность клеток изучали на 1-, 3- и 14-е сутки после введения наночастиц в организм.

Использованные дозы ФМ по-разному влияли на уровень РБТЛ (рис. 3). Так, на 1-е сутки изменения нестимулированной активности были незначительными (<5% по сравнению с контролем), однако отмечено их разнонаправленность в зависимости от дозы ФМ; отмечено угнетающее влияние ФМ во всех исследованных дозах на Т- и В-митогениндуцированную пролиферацию лимфоцитов. На 3-и сутки дозы 3 и 9 мг/кг выражено стимулировали как спонтанную, так и митогениндуцированную пролиферацию лимфоцитов; под влиянием дозы 300 мг/кг отмечено снижение пролиферативного пула лимфоцитов во всех пробах. На 14-е сутки зафиксировано снижение спонтанной и митогениндуцированной пролиферации лимфоцитов мышей, которым вводили ФМ в дозах 9 и 300 мг/кг; под действием дозы 3 мг/кг выявляли увеличение РНА-индуцированного ответа. Доза ФМ 30 мг/кг оказалась наименее эффективной во все сроки исследования (см. рис. 3).

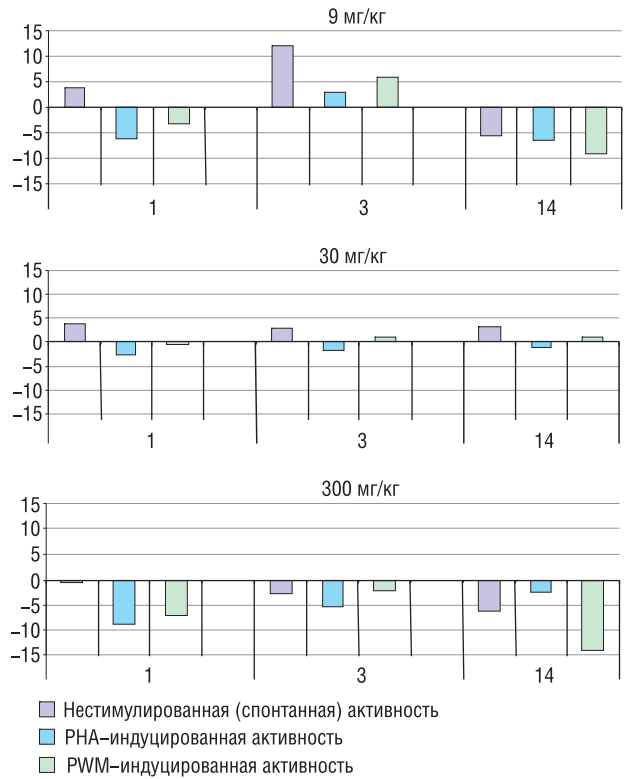
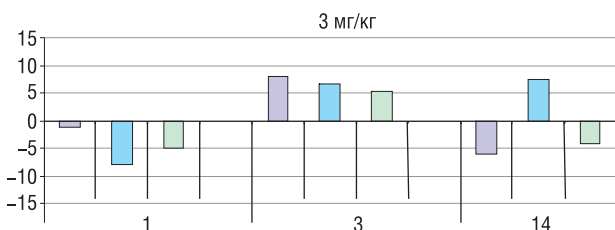
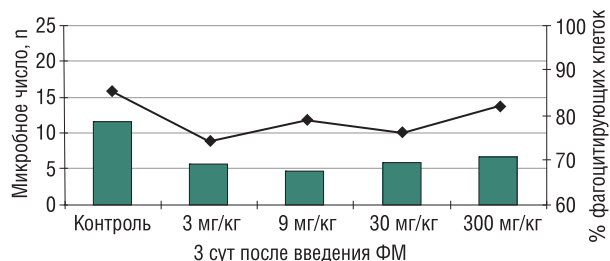
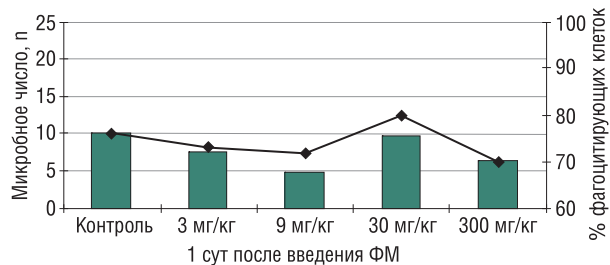


Рис. 3. Влияние ФМ на спонтанную и митогениндуцированную пролиферативную активность лимфоцитов лимфатических узлов: по оси абсцисс — время после введения ФМ мышам Balb/c, сут; по оси ординат — модуляция показателя по сравнению с контрольной группой (интактные животные), %

Изучение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, а также моноцитов и нейтрофилов периферической крови мышей после введения указанных доз ФМ показало следующее. При исследовании перитонеальных макрофагов на 1-е сутки отмечено достоверное угнетение их фагоцитарной активности под влиянием дозы 9 мг/кг, на 3-и сутки — под влиянием всех использованных доз; на 14-е сутки отмечено выраженное повышение активности под влиянием доз 9; 30 и 300 мг/кг ФМ. В этот период отмечали также увеличение количества фагоцитирующих клеток (рис. 4).



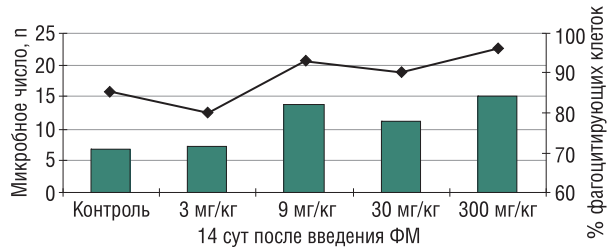


Рис. 4. Влияние наночастиц ФМ (при введении в организм) на фагоцитарную активность макрофагов

Фагоцитарная активность моноцитов крови увеличивается на 1-е сутки под влиянием дозы 30 мг/кг, на 3-и сутки — под влиянием 3 и 9 мг/кг. На 14-е сутки отмечено повышение фагоцитарной активности моноцитов при действии доз 3 и 9 мг/кг, доза 30 мг/кг увеличивает количество фагоцитирующих клеток (рис. 5).

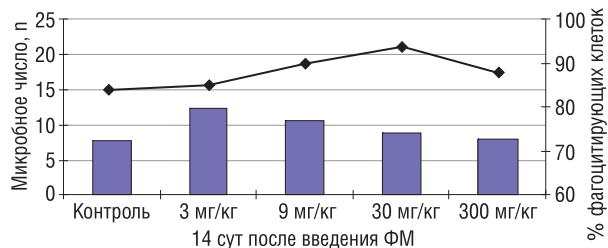
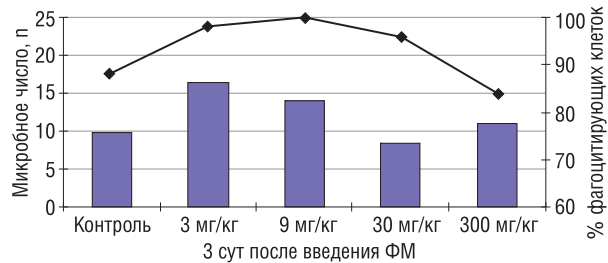
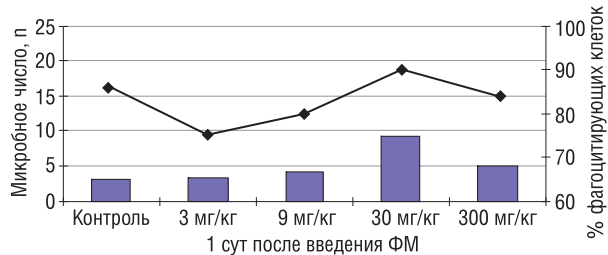


Рис. 5. Влияние наночастиц ФМ (при введении в организм) на фагоцитарную активность моноцитов

Активность нейтрофилов периферической крови на 1-е сутки после введения ФМ ингибируется под влиянием доз 3 и 9 мг/кг и достоверно стимулируется дозой 300 мг/кг. На 3-и сутки все дозы угнетают фагоцитарную активность нейтрофилов. Не отмечено существенных изменений фагоцитарной активности нейтрофилов на 14-е сутки после введения ФМ, однако отмечено уменьшение количества фагоцитирующих клеток (рис. 6).

Проведенные исследования показали, что при введении в организм интактных мышей различных доз ФМ выявлены дозозависимые изменения функциональной активности клеток системы иммунитета; минимальное влияние оказывает доза 30 мг/кг во все сроки наблюдения.

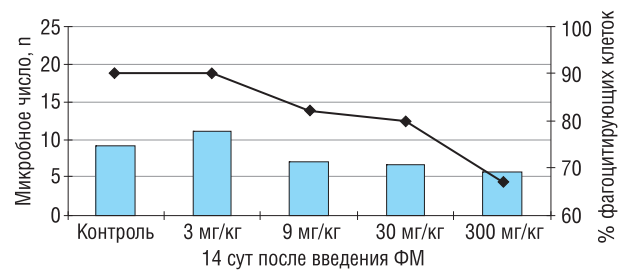
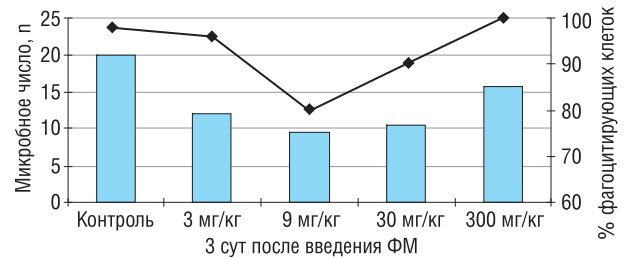
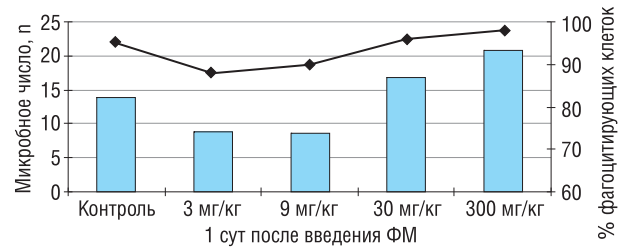


Рис. 6. Влияние наночастиц ФМ (при введении в организм) на фагоцитарную активность нейтрофилов

Таким образом, результаты наших исследований и данные литературы показывают, что наночастицы могут как стимулировать, так и подавлять функциональную активность. Эффект зависит как от исследованных клеток-мишеней, так и от дозы, времени и условий воздействия наночастиц. Дальнейшие исследования взаимодействия наночастиц с клетками системы иммунитета помогут выработать определенные критерии, которые могут быть использованы, во-первых, для создания общего представления о действии наночастиц, в том числе ФМ, в условиях нормы, а, во-вторых — при выборе подходов к их использованию с терапевтической целью.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительная оценка результатов исследования влияния наночастиц ФМ при его непосредственном влиянии на клетки иммунной системы и после введения в организм здоровых мышей позволила выявить как некоторые общие закономерности, так и различия. Общая закономерность — дозозависимость влияния наночастиц на характеристики всех исследованных клеток: лимфоцитов (Т- и В-) лимфатических узлов, перитонеальных макрофагов, нейтрофильных лейкоцитов и моноцитов периферической крови.

2. Различия проявлялись в следующем: а) при введении наночастиц в организм пролиферативная активность лимфоцитов (спонтанная и митогениндуцированная) чаще оказывалась сниженной, в отличие от этого непосредственное влияние наночастиц ФМ *in vitro* сопровождалось стимуля-

цией спонтанной пролиферативной активности и Т-митогениндуцированного ответа лимфоцитов; б) после введения частиц ФМ в организм активность фагоцитирующих клеток как угнеталась, так и стимулировалась в зависимости от условий (дозы и сроков воздействия), в системе *in vitro* отмечали стимуляцию активности указанных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol* 2007; **2** (8): 469–78.
2. Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* 2010; **151** (2): 458–65.
3. Chang C. The immune effects of naturally occurring and synthetic nanoparticles. *J Autoimmun* 2010; **34** (3): J234–46.
4. Finkelman FD, Yang M, Orekhova T, *et al.* Diesel exhaust particles suppress in vivo IFN-gamma production by inhibiting cytokine effects on NK and NKT cells. *J Immunol* 2004; **172** (6): 3808–13.
5. Schanen BC, Karakoti AS, Seal S, *et al.* Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an in vitro human immune construct. *ACS Nano* 2009; **3** (9): 2523–32.
6. Marquis BJ, Love SA, Braun KL, Haynes CL. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst* 2009; **134** (3): 425–39.
7. Mitchell LA, Lauer FT, Burchiel SW, McDonald JD. Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice. *Nat Nanotechnol* 2009; **4**: 451–6.
8. Park EJ, Kim H, Kim Y, *et al.* Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice. *Toxicology* 2010; **275** (1–3): 65–71.
9. Katsnelson B, Privalova LI, Kuzmin SV, *et al.* Some peculiarities of pulmonary clearance mechanisms in rats after intratracheal instillation of magnetite (Fe₃O₄) suspensions with different particle sizes in the nanometer and micrometer ranges: are we defenseless against nanoparticles? *Int J Occup Environ Health* 2010; **16** (4): 508–24.
10. Chen BA, Jin N, Wang J, *et al.* The effect of magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ on immune function in normal ICR mice. *Int J Nanomed* 2010; **5**: 593–9.
11. Wang J, Chen B, Jin N, *et al.* The changes of T lymphocytes and cytokines in ICR mice fed with Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Int J Nanomed* 2011; **6**: 605–10.
12. Chekhun VF, Todor IN, Lukyanova NY, *et al.* The use of nanoferromagnetics to increase the cytotoxic effect of antitumor drugs. *Exp Oncol* 2009; **31** (3): 163–7.
13. Бережная НМ, Бобкова ЛП, Бейко ВА и др. Разнообразие вариантов гиперреактивности В-лимфоцитов при

атопических аллергических заболеваниях. *Иммунология* 1997; (2): 53–5.

14. Храмовская НН, Орел ВЭ, Гриневич ЮА и др. Влияние механохимически гетерогенизированных опухолевых клеток на антиметастатический эффект дендритных клеток при иммунизации животных с карциномой Льюис. *Журн АМН України* 2007; **13** (3): 553–66.

15. Mitchell LA, Gao J, Wal RV, *et al.* Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol Sci* 2007; **100** (1): 203–14.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF IMMUNE CELLS OF INTACT MICE UNDER ITS INTERACTION WITH FERROMAGNETIC NANOPARTICLES IN VIVO AND IN VITRO

O.B. Belova, U.D. Vinnichuk, N.M. Berezhnaya

Summary. *There was studied the effect of ferromagnetic (Fe₃O₄ stabilized with polydextran, particle size – 40–60nm) on the immune system cells functional activity while direct interaction and after input into an animal organism. The objects of research were lymph nodes lymphocytes, peritoneal macrophages and peripheral blood neutrophils from Balb/c mice. It was shown that ferromagnetic nanoparticles dose-dependently change functions of these immune system cells. The changes had multidirectional nature which came out with suppression of lymphocytes proliferative response while input of nanoparticles into an organism and some stimulation of lymphocytes activity in direct influence of ferromagnetic; also activity of phagocytes changed, depending on conditions.*

Key Words: ferromagnetic nanoparticles, lymphocytes, macrophages, monocytes, neutrophils, phagocytosis, blast transformation.

Адрес для переписки:

Бережная Н.М.
03022 г. Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины
E-mail: berezh@onconet.kiev.ua