

УДК 636.028:591.43.436:591.8:636.087.72

## МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ОПТИМИЗАЦИИ ПУТЕЙ ВВЕДЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ТИПА $Cu_{10}X$ В ОРГАНИЗМ ЖИВОТНЫХ

*Сизова Е.А., Полякова В.С.**SIZOVA E. A., POLYAKOVA V.S.**ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**ОРЕНБУРГСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ**ORENBURG STATE UNIVERSITY**ORENBURG STATE MEDICAL ACADEMY*

*Comparative analysis of structural and functional reorganization of receipt of nanoparticles (muscle - intramuscular their introduction, the wall of the stomach and small intestine - with enteral their admission into the body) of biotransformation - the liver; has allowed the most structurally correct way to justify the introduction of nanoparticles.*

На основе современных морфологических подходов, включающих использование комплекса адекватных методов исследования: световой микроскопии, гистохимии, морфометрии, иммуноцитохимии установлены манифестные структурно-функциональные критерии, позволяющие оценить диапазон органотипических потенций в тканях первичного контакта при различных способах введения наночастиц  $Cu_{10}X$ . Сравнительный анализ структурно-функциональной реорганизации органов поступления наночастиц (мышцы - при внутримышечном их введении, стенки желудка и тонкого отдела кишечника - при энтеральном их поступлении в организм), органов биотрансформации – печени, позволил структурно обосновать наиболее корректный способ введения наночастиц.

Целесообразность и эффективность использования микроэлементов в питании человека и животных в форме частиц нанометрового размера не вызывает сомнения [1, 2, 3, 4, 5]. Однако, на ряду с работами, демонстрирующими низкую токсичность данных веществ [6, 7, 8], в литературе все больше исследований свидетельствует о широком перечне негативных последствий их использования [9, 10, 11]. В этой связи представляется актуальным разработка адекватных критериев безопасности наночастиц по отношению к человеку и животным, что возможно только при наличии методов, позволяющих всесторонне тестировать безопасность искусственных наноматериалов для широкого спектра биологических объектов.

В рамках проведенного исследования, изучена структурная реорганизация органов первичного контакта при различных путях введения наночастиц в организм животных. Дана оценка степени повреждающего действия наночастиц при внутримышечном и энтеральном путях их введения, с целью решения вопроса о возможности использования наночастиц металлов-микроэлементов как основы для создания комплексных препаратов, обладающих полифункциональным и пролонгированным действием.

### Материал и методы

В исследованиях использовали крыс-самцов линии Wistar, массой 150-170г. Инъекционную форму с наночастицами меди вводили экспериментальным животным в бедренную группу мышц в дозе 2,0 мг/кг массы животного с периодичностью 7 дней в течение 12 недель. Убой животных проводили путем декапитации под нембуталовым наркозом по следующей схеме: через сутки после первой инъекции – 1 группа, через 7 суток после первой инъекции – 2 группа, через 7 суток после второй инъекции – 3 группа, через 7 суток после второй инъекции – 4 группа, через 7 суток после третьей инъекции – 5 группа, через 7 суток после третьей инъекции – 6 группа, через 7 суток после четвертой инъекции – 7 группа, через 7 суток после 12 инъекции – 8 группа. Животным контрольной группы вводили дистиллированную воду и убой проводили в те же сроки. Одновременно, на протяжении 3 дней выпаивали суспензию наночастиц меди типа Cu10x в дозе 2,0 мг/кг массы животного. Убой животных проводили путем декапитации под нембуталовым наркозом по следующей схеме: через 1 час после введения – 1 группа, через 2 часа после введения – 2 группа, и через трое суток после ежедневного введения – 3 группа.

Наночастицы были получены методом высокотемпературной конденсации, на установке Миген-3. Модификацию проводили в контролируемых условиях при подаче кислорода, паров воды, атмосферного воздуха. Определение формы и размеров проводили методом сканирующей электронной микроскопии (микроскоп JSM, фирмы JOEL) напряжение 1 кВ. Для приготовления образца нанопорошок подвергали кратковременному ультразвуковому диспергированию в ацетоне. Затем наночастицы наносили на специальную углеродную подложку и помещали в микроскоп. Для определения диаметра измеряли поперечник с помощью компьютерной программы Микран – 25.

Для выявления экзогенной меди в фиксированных гистосреззах применяли метод с бензидином, который был нами модифицирован (экспериментально подобран срок инкубации препаратов в среде, содержащей солянокислый бензидин и тиацианат аммония, и температурный режим), что позволило выявить наночастицы меди в исследуемых органах. Для световой микроскопии парафиновые срезы толщиной 5-6 мкм окрашивали гематоксилином Майера-эозином. Иммуногистохимические исследования проводили на парафиновых срезах при помощи моноклональных антител (Caspase-3, Ki – 67, Bcl-2) и системы визуализации фирмы Bio Genex Super Sensytive Detection System, США. Производили подсчет иммунопозитивных клеток на 1000 и выражали в %.

Основные данные были подвергнуты статистической обработке с использованием программ Excel, Statistica 5.

В ходе проведения эксперимента соблюдались правила проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приказ №755 от 12.08.1977 МЗ СССР).

### Результаты и их обсуждение

При сканирующей электронной микроскопии установлено, что наночастицы меди типа Cu10x представляют собой сферические частицы размером  $103,0 \pm 2,0$  нм с оксидной пленкой толщиной 6 нм. Методом рентгенофазового анализа определен их состав: меди кристаллической 96%, меди оксида 4%.

Анализ структурно-функциональной реорганизации органов экспериментальных животных после различных способов введения наночастиц меди (внутримышечное, энтеральное) позволил выделить среди них наиболее опти-

мальный – энтеральный путь. В пользу последнего свидетельствуют морфологические факты, выявленные нами в ходе сравнительного исследования мест введения (мышцы - при внутримышечном введении, стенки желудка и тощей кишки - при энтеральном).

При исследовании мышцы через 3 часа после введения наночастиц меди в дозе 2,0 мг/кг массы, в зоне введения не выявляются, что связано, на наш взгляд, с быстрым проникновением их в сосуды. Однако в мышце в месте введения наночастиц наблюдается восковидный некроз, в зоне которого при исследовании через сутки обнаруживается реакция в виде демаркационного острого воспаления с последующими протекающими здесь при исследовании через 1,2,3 недели процессами регенерации мышечной ткани. При повторных через неделю введениях наночастиц в зоне демаркационного воспаления, окружающего зону некроза наночастицы выявляются в цитоплазме находящихся здесь макрофагов.

При энтеральном поступлении наночастиц в организм животных через 1 час после их введения в желудке выявляется очаговое повреждение покровного эпителия, наночастицы меди обнаруживаются в виде гомогенного серо-синего окрашивания в базальной части париетальных клеток и в виде темно-синих зерен в соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки в проекции повреждения покровного эпителия. Через 2 часа после введения наночастиц меди признаков повреждения покровного эпителия желудка нет, но в собственной пластинке слизистой обнаруживаются небольшое содержание наночастиц меди. В стенке тощей кишки через 2 часа после энтерального введения наночастиц меди каких либо выраженных структурных изменений не обнаруживается, что вероятно связано с их активным всасыванием в слизистой оболочке желудка. Наночастицы меди в стенке тощей кишки не обнаруживаются. При повторном энтеральном введении наночастиц в стенке желудка наряду с появлением локальных участков повреждения поверхностного эпителия и дистрофическими изменениями главных клеток в теле фундальных желез, увеличивается щеечная часть желез, содержащая клетки, являющиеся источником регенерации покровного эпителия желудка и желез. Это подтверждает способность пограничных тканей, сформировавшуюся в ходе филогенеза, к активной регенерации и большей устойчивости к повреждающим воздействиям.

При энтеральном пути поступления наночастиц меди в печени уже через 2 часа обнаруживаются признаки гидропической дистрофии в гепатоцитах перипортальной зоны. В гепатоцитах наночастицы не выявлялись, они обнаруживались только в клетках Купфера. Обнаруженные в печени структурные изменения через 2 часа после энтерального введения наночастиц носят обратимый характер, о чем свидетельствует неизменная структура печени на 3 сутки после введения. При исследовании печени через 2 часа после третьего энтерального введения наночастиц они обнаруживаются в клетках Купфера и васкулярной зоне гепатоцитов, признаки дистрофии в клетках отсутствует. Готовность клеток к апоптозу после трехкратного энтерального введения недостоверно отличается от показателей экспрессии маркеров апоптоза в печени контрольной группы животных. Ожидая большее повреждающее действие наночастиц меди на структуру печени при энтеральном пути введения мы получили противоположные морфологические факты, требующие дальнейшего исследования: либо это результат изменения наночастиц в желудочно-кишечном тракте, либо включение защитно-приспособительных реакций в органе, обеспечивающих биохимический гомеостаз в гепатоцитах, выявляемых на субмикроскопическом уровне.

При исследовании печени через 3 часа после однократного внутримышечного введения наночастиц меди последние обнаруживаются в васкулярной части преимущественно перипортальных гепатоцитов и в цитоплазме клеток Купфера. Видимых структурных изменений в органе при этом сроке исследования не выявляется. На 3 сутки после однократного внутримышечного введения наночастицы меди в клетках печени не обнаруживаются, в перипортальных гепатоцитах появляются признаки гидропической дистрофии, об обратимости которой свидетельствует исследование органа на 7 сутки после однократного введения наночастиц. При повторном (через неделю) внутримышечном введении наночастиц они также выявляются преимущественно в васкулярной части перипортальных гепатоцитов, но проявления гидропической дистрофии в них обнаруживается уже на следующие сутки после введения, что свидетельствует о большем повреждающем влиянии повторных внутримышечных введений наночастиц. Это подтверждают иммуногистохимические исследования по выявлению готовности гепатоцитов к клеточной гибели - апоптозу. Последний является процессом в паренхиме печени, поддерживающим структурный гомеостаз органа. В печени контрольных животных экспрессия антигена каспазы 3 обнаружена только среди центролобулярных гепатоцитов, она составила  $0,7 \pm 0,03\%$ . Арротаг – положительны клетки также выявляются среди центролобулярных гепатоцитов и составляют  $0,5 \pm 0,02\%$ . После повторного внутримышечного введения наночастиц меди, клетки, экспрессирующие антиген каспазы - 3, а также дающие положительную реакцию на фрагментированную ДНК обнаруживаются и среди перипортальных гепатоцитов. Различия показателей экспрессии маркеров готовности клеток к апоптозу достоверны по сравнению с контролем в печени животных на 3 и особенно на 7 сутки после трехкратного внутримышечного введения наночастиц. Показатели экспрессии увеличиваются в 2 раза ( $P < 0,05$ ) на 7 сутки после трехкратного внутримышечного введения.

Таким образом, при изучении структурно-функциональных изменений тканей органов-мишеней необходимым критерием следует считать показатель, позволяющий оценить степень апоптоза клеток при введении наночастиц металлов. Выявленные морфологические факты: меньшее повреждающее влияние наночастиц меди в зоне введения (стенка желудка и тощей кишки), выявленная иммуногистохимически меньшая готовность клеток печени к запрограммированной клеточной гибели позволяют сделать вывод, что энтеральный путь введения является более корректным по сравнению с внутримышечным.

#### Литература:

1. Верников В.М., Арканова Е.А., Гмошинский, И.В., Хотимченко С.А., Тутельен В.А./Нанотехнологии в пищевых производствах: перспективы и проблемы// Вопросы питания- т.78 - №2 – 2009 – с. 4 – 17.
2. Глуценко Н.Н., Богословская О.А., Сизова Е.А., Полякова В.С., Мирошников С.А., Изучение безопасности введения наночастиц металлов в организм // Материалы XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». - Москва, 2009 г. - С. 533.
3. Пиотровский А.Б., Киселев О.И.//Фуллерены в биологии. СПб., 2006
- 4.Полякова В.С. Богословская О.А. Сизова Е.А., Мирошников С.А. Глуценко Н.Н.Исследование безопасности попадания наночастиц металлов в организм животных//Материалы II Международной научной конференции. «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных». Саранск. -

2009 — с. 121-123.

5. Сизова Е.А., Полякова В.С., Мирошников С.А., Богословская О.А., Лейпунский И.О., Ольховская И.П., Глушенко Н.Н. Оценка безопасности наночастиц меди с различными физико-химическими характеристиками по показателям токсичности//Тезисы докладов XXIII Люблищевские чтения. - Ульяновск, 2009 г. - С. 339-341
6. Cappuis P., Aral B., Ceballos-Picot I. Copper related diseases // Metal Ions in Biology and Medicine/ Eds Ph Collery, P. Bratter, V. Negretti de Bratter, L. Khassanova, J. C. Etienne. Paris: John Libbey Eurotex. 1998. Vol. 5. P. 729-736.
7. Chandhry Q., Scotter M., Blackburn J. et al //Food Additives Contaminants – 2008 – Vol. 25 - №3 – p. 241 - 259.
8. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. //Environ. Health Perspect/ 2005. Vol. 113,N 7. P 823-839.
9. Olin S. // J. Nutr. – 1998 – Vol. – 128 – Suppl. 1 – p. 364S – 367S.
10. Rohner F., Ernst F. O., Arnold M. et al // J. Nutr. – 2007 – Vol. 137 - №3 – p. 614 – 619.
11. Zhang J., Wang H., Yan X., Zhang L. // Life Sci. – 2005 – Vol. 76 - №10 – p. 1099-1109.

УДК 636.2.033

## СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ СОХРАННОСТИ И ПРОДУКТИВНОСТИ ПОРОСЯТ WAYS TO IMPROVE SAFETY AND EFFICIENCY OF PIGLETS

**СМОЛЕНЦЕВ С.Ю.**  
**SMOLENTSEV S.Y.**

*АГРАРНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ МАРИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО  
УНИВЕРСИТЕТА  
AGRARNO-TECHNOLOGY INSTITUTE MARI STATE UNIVERSITY*

*Thus, studies have shown that the use immunostimulators in combination with a drug “Felucia” glubokosuporostnym and suckling sows is an effective way to enhance security derived from their offspring.*

Незаразные болезни занимают одно из лидирующих положений среди всех болезней животных, особенно у молодняка. Заболеваемость и гибель молодняка сельскохозяйственных животных от незаразных болезней причиняют значительный экономический ущерб [1;2]. На долю молодняка приходится примерно 70-90% падежа по сравнению с взрослыми животными, что в свою очередь свидетельствует о большой значимости диагностики, лечения и профилактики болезней обмена веществ [3].

Материалы и методы. Опыт был проведен в условиях СХА «Искра» где по принципу аналогов были сформированы 3 группы свиноматок по 5 животных в каждой. Свиноматкам первой группы за 30 дней до опороса внутримышечно ввели препарат «Иммуноферон» в дозе 5 мл, двукратно с интервалом 24 часа. Свиноматкам второй группы внутримышечно ввели препарат «Лечебно-профилактический иммуноглобулин», в дозе 20 мл, двукратно с интервалом 48 часов.