

ОСНОВНІ ПОКАЗНИКИ ГЕМОПОЕЗУ ТА СТАНУ ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОГО НАВАНТАЖЕННЯ НАНОЧАСТКАМИ КОБАЛЬТУ ТА ХЛОРИДОМ МЕТАЛУ

Турко Я.І.

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С.З. Гжицького, м. Львів, Україна, e-mail: 2008pik@gmail.com*

Ушкалов В.О.

*Державний науково-контрольний інститут біотехнології
і штамів мікроорганізмів, м. Київ, Україна*

Досліджено вплив наночастинок Кобальту на деякі показники стану імунної системи та гемопоезу на моделі лабораторних тварин за умов хронічного токсикологічного експерименту. У дослідженнях на білих щурах у дозі наночастинок Co 0,1 мг/кг маси тіла встановлено найвищі показники «червоної» крові на 30-, 60- та 90-ту добу від початку їх згодовування. Встановлене підвищення рівня загального білку та глобулінів у крові щурів за дози наночастинок Кобальту 0,1 мг/кг маси тіла на 30-, 60- та 90-ту добу відносно їх контрольних значень свідчить про індукцію імунної відповіді. При цьому не визначали збільшення кількості циркулюючих імунних комплексів і серомукоїдів, що могло б вказувати на функціональне напруження стану імунітету. Результати вивчення впливу хронічного навантаження наночастиками Кобальту на організм лабораторних тварин, свідчать про біосумісність наночастинок Кобальту у дозі 0,1 мг/кг маси тіла.

Ключові слова: наночастинок Кобальту, хронічна токсичність, кров, білки, гемоглобін, еритроцити, лейкоцити, серомукоїди, щурі.

На думку багатьох експертів у XXI столітті нанотехнології будуть активно розвиватись. Під терміном «нанотехнології» розуміють сукупність методів і прийомів, що забезпечують створення об'єктів з компонентами розміром менше 100 нм. Ці об'єкти мають принципово нові якості і можуть об'єднуватись у функціонуючі системи макромасштабу [1]. Наночастинок впливають на біологічні об'єкти на клітинному рівні, підвищуючи ефективність біологічних процесів, а також беручи участь у формуванні мікроелементного балансу, тобто є біологічноактивними. Отримані варіанти наночастинок ряду металів, на відміну від їх солей, потенційно менш токсичні [3, 4, 7]. Вони всмоктуються поступово, але швидко включаються в біохімічні реакції: таким чином досягається пролонгуючий ефект [2]. Вивчення позитивних сторін нанотехнологій проходить паралельно з оцінкою і попередженням ризиків від їх використання. Розробляються концепції токсикологічних досліджень, методології оцінки ризиків, ідентифікації і кількісного визначення наноматеріалів, в яких визначаються особливості нанопродуктів, їх можливий вплив на організм і необхідність нормування цього впливу [4].

Враховуючи результати наших попередніх досліджень стосовно дії препарату наночастинок Кобальту на гомеостаз організму щурів в гострому токсикологічному експерименті [6], метою роботи було визначити вплив наночастинок Кобальту на деякі показники стану імунної системи та гемопоезу на моделі лабораторних тварин за умов хронічного токсикологічного експерименту.

Матеріали та методи. У роботі використовували дослідний зразок наночастинок Кобальту (Нч Co) середнього розміру (~100,0±10,0 нм), виготовлений за оригінальною методикою фахівцями Інституту біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України.

Враховуючи позитивну дію на організм щурів наночастинок Co в дозах 0,05–0,10 мг/кг маси тіла, було проведено хронічний дослід на щурах. Для цього за принципом аналогів було сформовано 4 групи щурів-самців (n=80) лінії Вістар масою 180–200 г по 20 тварин у кожній. Тваринам I, II, III дослідних груп було задано з кормом впродовж 90 діб розчин кобальту хлориду 0,1 мг/кг маси тіла за металом (I-а дослідна група), розчин наночастинок Кобальту 0,1 мг/кг маси тіла (біотична доза) (II-а дослідна група) і розчин наночастинок Кобальту 1,0 мг/кг маси тіла (умовно-токсична доза) (III-а дослідна група). Щурам контрольної групи було задано за аналогічним регламентом по 2,0 см³ дистильованої води. З метою визначення біосумісності дослідного зразка наночастинок металу на 15-, 30-, 60- і 90-ту добу проводили декапітацію 5 тварин із групи (за умов легкого хлороформного наркозу) і відбирали кров для досліджень. У цільній крові експериментальних тварин проводили визначення кількості формених елементів, загального гемоглобіну (Hb) та лейкоцитів за загальноприйнятими методиками. У плазмі крові експериментальних тварин досліджували рівень загального білку, альбумінів та глобулінів з використанням стандартних наборів реактивів (НВП «Філісіт-Діагностика», Україна), циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) методом Гриневича Ю.А. (1985) шляхом осадження білкових комплексів антиген-антитіло ПЕГ-6000 та серомукоїдів (Sm)– спектрофотометрично («SHIMADZU UV-1800», Японія) за різницею оптичної щільності за довжин хвиль 260 нм і 280 нм [5].

Результати досліджень. У результаті досліджень встановлено (табл. 1), що починаючи з 60-ої та по 90-ту добу включно, у крові щурів III дослідної групи (1,0 мг/кг маси тіла) реєстрували зростання кількості лейкоцитів ($p \leq 0,05$), яке на 90-ту добу досліді складало 28,2 % відносно рівня цього показника в контрольних тварин.

Розділ 5. Імунологія

Нч Со у більшій дозі викликали вірогідне зниження кількості еритроцитів та загального Нв лише через 90 діб після початку їх задавання, що дорівнювало відповідно 15,5 та 18,0 % відносно контрольного рівня цих показників. При цьому зниження рівня таких показників починали реєструвати вже з 30-ої доби від початку експерименту.

У нижчій дозі (0,1 мг/кг маси тіла) наночастки Со впливали позитивним чином на показники «червоної» крові. Так, на 30-, 60- та 90-ту добу від початку згодування наночасток визначали вірогідне підвищення кількості еритроцитів у крові щурів у середньому на 20,9, 17,0 та 10,7 % відносно їх значень у контролі. Подібним чином змінювався вміст гемоглобіну в крові щурів I і II дослідних груп: рівень показника мав тенденцію до підвищення на 30- та 60-ту добу досліду, але набував вірогідності лише на 90-ту добу в крові щурів лише II групи під впливом Нч Со у дозі 0,1 мг/кг маси тіла.

Таблиця 1 – Рівень лейкоцитів, еритроцитів та загального гемоглобіну у крові щурів за хронічного перорального введення Кобальту у вигляді його солі та наночасток у динаміці 90 діб ($M \pm m$; $n=5$)

Групи тварин		Термін дослідження, доба			
		15-та	30-та	60-та	90-та
Лейкоцити, $10^9/\text{дм}^3$					
К	Контроль	10,80±0,83	10,10±1,08	9,55±0,82	9,92±1,15
I	Кобальту хлорид – 0,1 мг/кг маси тіла	10,64±1,02	9,42±0,96	10,04±1,04	10,06±0,85
II	Нч Со – 0,1 мг/кг маси тіла	10,45±1,12	9,98±1,05	11,08±2,02	10,07±0,25
III	Нч Со – 1,0 мг/кг маси тіла	10,94±0,75	11,28±1,86	12,02±0,34*	12,72±1,05*
Еритроцити, $10^{12}/\text{дм}^3$					
К	Контроль	8,42±0,25	8,20±0,39	7,92±0,31	8,30±0,19
I	Кобальту хлорид – 0,1 мг/кг маси тіла	8,59±0,93	8,99±0,81	8,09±0,68	8,19±0,61
II	Нч Со – 0,1 мг/кг маси тіла	8,98±0,64	9,91±0,22*	9,27±0,52*	9,19±0,21*
III	Нч Со – 1,0 мг/кг маси тіла	9,05±0,42	8,08±0,29	8,09±0,43	7,18±0,29*
Загальний Нв, г/дм³					
К	Контроль	120,40±8,50	121,00±9,57	121,50±8,18	121,50±5,18
I	Кобальту хлорид – 0,1 мг/кг маси тіла	115,60±9,20	127,40±8,44	126,80±10,30	125,80±8,30
II	Нч Со – 0,1 мг/кг маси тіла	118,20±10,30	127,10±6,60	128,08±6,00	132,02±8,10*
III	Нч Со – 1,0 мг/кг маси тіла	108,60±8,50	116,00±10,30	116,20±8,06	99,60±9,22*

Примітка: * – різниця значень вірогідна при ($p \leq 0,05$) відносно значень такого показника у контрольних тварин

Стосовно показників білкового профілю та стану неспецифічної резистентності встановлено (табл. 2), що вже на 30- та 60-ту добу досліду в плазмі крові щурів, яким задавали Нч Со у дозі 0,1 мг/кг маси тіла (II дослід), реєстрували вірогідне підвищення вмісту загального білку в середньому на 14,8 % та 16,5 %, а у дозі 1,0 мг/кг маси тіла – зниження на 15,7 % відповідно відносно контрольного рівня цього показника. На 90-ту добу від початку експерименту такі зміни набували лише тенденцій.

Про індукцію імунної відповіді свідчить визначене підвищення рівня загальних глобулінів у крові щурів I дослідної групи на 60-ту добу досліду на 28,6 %, II дослідної групи – на 30-, 60- та 90-ту добу включно у середньому на 21,1, 36,2 та 29,6 % ($p \leq 0,05$) відносно їх контрольних значень.

Таблиця 2 – Стан показників білкового профілю та неспецифічної резистентності у плазмі крові щурів за хронічного перорального введення Кобальту у вигляді його солі та наночасток у динаміці 90 діб ($M \pm m$; $n=5$)

Група тварин	Термін досліджень, доба	Загальний білок, г/дм ³	Альбуміни, г/дм ³	Глобуліни, г/дм ³	ЦІК, мг/см ³	Sm, мг/см ³
Контроль	15	60,70±1,83	36,00±0,20	24,70±2,05	0,058±0,005	0,069±0,005
	30	58,90±1,73	38,00±1,40	20,90±1,50	0,068±0,006	0,066±0,008
	60	58,80±3,83	36,40±1,06	22,40±1,12	0,065±0,003	0,070±0,005
	90	61,60±1,43	39,20±1,40	22,40±2,62	0,062±0,004	0,067±0,010

Кобальту хлорид 0,1 мг/кг маси тіла	15	60,30±0,57	35,60±0,82	24,70±2,00	0,066±0,008	0,061±0,007
	30	61,70±2,17	37,20±1,05	24,50±1,25	0,073±0,006	0,071±0,003
	60	63,80±3,87	35,00±2,80	28,80±2,05*	0,078±0,002*	0,068±0,006
	90	60,80±2,90	36,20±1,40	24,60±2,50	0,066±0,006	0,068±0,008
Нч Со – 0,1 мг/кг маси тіла	15	64,30±0,70	38,00±1,25	26,30±2,05	0,064±0,003	0,070±0,007
	30	67,60±3,70*	37,70±2,56	29,90±0,80*	0,070±0,007	0,071±0,004
	60	68,50±1,50*	38,00±2,20	30,50±2,15*	0,067±0,008	0,069±0,010
	90	65,53±2,40	36,50±3,40	29,03±2,25*	0,068±0,004	0,066±0,009
Нч Со – 1,0 мг/кг маси тіла	15	60,00±0,90	36,80±3,50	23,20±0,56	0,063±0,010	0,105±0,009*
	30	56,90±2,70	37,80±1,00	19,10±1,64*	0,063±0,007	0,095±0,007*
	60	51,90±0,80*	35,75±3,00	16,15±1,35*	0,073±0,011	0,120±0,010*
	90	53,23±4,03	36,2±2,00	17,03±1,12*	0,090±0,003*	0,125±0,016*

Примітка: * – різниця значень вірогідна при (p ≤ 0,05) відносно значень такого показника у контрольних тварин

При цьому підвищення вмісту загальних глобулінів у крові щурів, що одержували Кобальту хлорид, визначали поряд із вірогідним збільшенням кількості ЦІК у середньому на 20,0 % відносно їх рівня в контрольних тварин, що вказує на функціональне напруження стану гуморальної ланки імунітету.

У плазмі крові щурів III дослідної групи, які одержували Нч Со у більшій дозі (1,0 мг/кг маси тіла), навпаки, визначали поряд зі зниженням рівня загального білку зниження значень загальних глобулінів з 30- по 90-ту добу експерименту включно. Внаслідок тривалого потрапляння наночастинок у більшій дозі також реєстрували спочатку тенденцію до збільшення утворення ЦІК, що набуло вірогідності на 90-ту добу експерименту та склало 45,2 % відносно їх контрольних значень. Поряд з цим, у крові тварин цієї групи, починаючи з 15-ої доби та по 90-ту добу досліду включно визначали вірогідне зростання білків – серомукоїдів від 43,9 до 86,6 % відносно значень показника у групі контролю.

Автори висловлюють подяку співробітникам ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН: канд. біол. наук М.Є. Романько і канд. вет. наук О.Л. Оробченку – за методичну та консультаційну допомогу, та співробітникам Інституту біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України канд. біол. наук Т.Г. Грузиній та Л.С. Резніченко – за надання для експерименту зразків колоїдного розчину наночастинок кобальту.

Висновки. Хронічне надходження з кормом наночастинок Кобальту в організм щурів у дозі 0,1 мг/кг маси тіла призводить до вірогідного підвищення показників «червоної» крові (кількості еритроцитів та загального гемоглобіну) в динаміці експерименту у порівнянні з контролем та аналогом (кобальту хлоридом), що свідчить про стимуляцію гемопоезу у лабораторних тварин. Зниження аналогічних показників за введення наночастинок Со в дозі 1,0 мг/кг маси тіла та підвищення кількості лейкоцитів на останніх термінах досліду свідчить про пригнічення гемопоезу та розвиток запальних процесів у щурів.

2. Підвищення рівня загального білку за рахунок глобулінової фракції і відсутність змін показників ЦІК та Sm в динаміці експерименту у плазмі крові щурів, які отримували наночастинок Со в дозі 0,1 мг/кг маси тіла, свідчить про стимуляцію імунної відповіді, більш виражену, ніж за введення кобальту хлориду. Підвищення рівня загального білка за зниження глобулінової фракції поряд з підвищенням показників ЦІК та Sm в плазмі щурів, яким вводили наночастинок Со в дозі 1,0 мг/кг маси тіла, свідчать про функціональне напруження стану імунітету.

3. Результати вивчення впливу хронічного навантаження наночастинками Кобальту на організм лабораторних тварин, свідчать про біосумісність наночастинок Кобальту у дозі 0,1 мг/кг маси тіла.

Перспективи подальших досліджень. Наступним етапом досліджень буде вивчення впливу наночастинок Кобальту на гомеостаз організму курей, зокрема стану резистентності, як можливого чинника зменшення відходу птиці у процесі технологічного циклу вирощування та пропозиція технологічних схем застосування цього препарату.

Список літератури

1. Асанов У.А. Электроэрозионная технология соединений и порошков металлов [Текст] / У.А. Асанов, А.Д. Цой, А.А. Щерба. – Фрунзе: Илим, 1990. – 256с.
2. Ильин А.П. Биологическая активность нанопорошков металлов, полученных с помощью электрического взрыва проводников [Электронный ресурс] / А.П. Ильин, А.В. Коршунов, Л.О. Толбанова, А.П. Астанкова. – Режим доступа: nanosvit.com/public/docs/nanoparticles_1.pdf
3. Зайцев С.Ю. Мембранные наноструктуры на основе биологически активных соединений для бионанотехнологий [Текст] / С.Ю. Зайцев // Российские нанотехнологии. – 2009. –Т.4. – № 7-8. – С. 44-45
4. Каплуненко В.Г. Нанотехнологии в сельском хозяйстве [Текст] / В.Г. Каплуненко, Н.В. Косинов, А.Н. Бовсуновский, С.А. Черный // Зерно. – 2008. – № 11(31). – С. 80-83

5. Кондрахин И.П. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии [Текст] / И.П. Кондрахин, Н.В. Курилов, А.Г. Малахов [и др.]. – М., 1985. 115 с.
6. Турко Я.І. Гематологічні та біохімічні маркери крові щурів за гострого токсикологічного експерименту з використанням нанокобальту [Текст] / Я.І. Турко, В.О. Ушкалов // Науковий вісник ЛНУВМ та БТ імені С.З. Гжицького 2014. – Том 16, №3(60) Частина 1.– С. 354 – 360
7. Nesli S. Nanotechnology and its application in the food sector [Текст] / S.Nesli, L. Jozef // Trends in Biotechnology. – 2009. – Vol. 27. – № 2. – P.82-89

MAIN INDICATORS HEMATOPOESIS AND IMMUNE SYSTEM IN RATS DURING CHRONIC STRESS NANOPARTICLES COBALT AND METAL CHLORIDE

Turko Ya.I.

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology named after S.Z.Gzhytskyi, Lviv, Ukraine

Ushkalov V.O.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv, Ukraine

To determine the effect of cobalt nanoparticles on some parameters of the immune system and hematopoiesis on the models of laboratory animals under conditions of chronic toxicological experiment was the purpose of search.

According to the principle of analogues it was formed 4 groups of male rats (n = 80) of line Wistar which were given cobalt chloride solution 0.1 mg/kg body of weight for metal (I-group), a solution of cobalt nanoparticles 0.1 mg/kg of body weight (group II) and cobalt nanoparticles solution of 1.0 mg/kg of body weight (group III) with food for 90 days. At the 15-, 30-, 60- and 90-th day in the blood plasma of experimental animals it was studied the level of total protein, albumin and globulin, circulating immune complexes and seromucoid. In whole blood of experimental animals the number of formed elements, hemoglobin and white blood cells were determining.

Chronic receipt of cobalt nanoparticles food in rats at a dose of 0,1 mg/kg body weight leads to a significant increase in performance red blood cell and total hemoglobin in the dynamics of experiment compared to control and analogue (cobalt chloride), indicating that stimulation of hematopoiesis in laboratory animals. Reduction of similar indicators for the introduction Co nanoparticles at a dose of 1,0 mg/kg body weight and increase the number of leukocytes in the last term experiment demonstrates suppression of hematopoiesis and development of inflammation in rats.

Increased total protein by globulin fraction and no changes of circulating immune complexes and seromucoid dynamics experiment in plasma rats treated with nanoparticles of Co at a dose of 0,1 mg/kg body weight, indicates stimulation immune response, more pronounced than introduction of cobalt chloride. Increased total protein by reducing globulin fraction along with the performance of circulating immune complexes and seromucoid in plasma of rats injected nanoparticles Co in a dose of 1,0 mg/kg body weight, showed functional stress state immunity.

The results study of chronic stress cobalt nanoparticles in laboratory animals indicate biocompatible cobalt nanoparticles at a dose of 0,1 mg/kg body weight.

Keywords: cobalt nanoparticles, chronic toxicity, blood proteins, hemoglobin, red blood cells, white blood cells, seromucoid, rats.