

УДК: 615. 847. 8: 616. 21

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ОТОРИНОЛАРИНГОЛОГИИ

(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

К. Г. Добрецов¹, В. Ю. Афонькин¹, С. В. Столяр^{4,5}, В. П. Ладыгина³,
А. В. Сипкин¹, К. В. Пуртов², О. А. Баюков^{4,5}, А. С. Лопатин⁶

RESEARCH OF MAGNETIC NANOPARTICLES' PECULIARITIES IN OTORHINOLARYNGOLOGY

(EXPERIMENTAL RESEARCH)

K. G. Dobretsov, V. YU. Afon'kin, S. V. Strolyar, V. P. Ladygin,
A. V. Sipkin, K. V. Purtoov, O. A. Bayukov, A. S. Lopatin

¹Дорожная клиническая больница на станции Красноярск
(Директор – канд. мед. наук В. В. Саклакова)

²Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск
(Директор – член-корр. РАН А. Г. Дегерменджи;

³Международный научный центр исследований экстремальных состояний
организма при Президиуме КНЦ СО РАН, Красноярск
(Исполнительный директор – проф. Р. Г. Хлебопрос;

⁴Сибирский федеральный университет, г. Красноярск
(Ректор – академик РАН Е. А. Ваганов)

⁵Институт физики СО РАН, г. Красноярск
(Директор – академик РАН В. Ф. Шабанов)

⁶Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова
(Ректор – академик РАН и РАМН М. А. Пальцев)

Настоящее исследование посвящено изучению возможности целенаправленной доставки антибиотиков с помощью магнитных наночастиц. В результате 30 опытов на удаленной слизистой оболочке, хрящевой и костной тканях носа, 10 опытов на здоровых нейтрофилах человека и 10 опытов на обсемененных бактериями средах, было выявлено, что благодаря градиенту магнитного поля магнитные наночастицы проникают в толщу слизистой оболочки носа, хрящевой и костной тканей носа. Было доказано, что магнитные наночастицы не являются цитотоксичными, а комплекс наночастица-антибиотик является стабильным и обладает бактерицидными свойствами.

Ключевые слова: наночастицы, магнитное поле, цитотоксичность.

Библиография: 12 источников

We studied opportunities of targeted delivery of antibiotics by magnetic nanoparticles. The results of 30 experiments on extracted mucosa of cartilaginous and bone tissue, 10 experiments on healthy human neutrophils and 10 – environment occupied by bacteria showed that magnetic nanoparticles penetrate in mucosa of cartilaginous and bone tissue of nose due to gradient of magnetic field. It was proved that magnetic nanoparticles are not cytotoxic and complex of nanoparticle-antibiotic is a stable and has bacteriocidal properties.

Key words: nanoparticles, magnetic field, cytotoxicity.

Bibliography: 12 sources.

Первое упоминание о наночастицах относится к 1959г, когда о новых направлениях научно-технического развития высказался лауреат Нобелевской премии Ричард Фейнман в Калифорнийском технологическом институте [4]. Под термином «наночастицы» обычно понимают



коллоидные частицы размером от 10 до 1000 нанометров, состоящие из макромолекулярного материала, в который активно внедрено (растворено, связано, инкапсулировано) и/или на котором адсорбировано лекарственное вещество [5, 10, 11]. Способы введения наночастиц в организм различные: пероральный, внутривенный, внутримышечный, ингаляционный, интраокулярный. Возможна также интра- и трансдермальная подача наночастиц [3, 7, 1, 9].

Магнитные наночастицы по сравнению с другими наноносителями значительно отличаются возможностью бесконтактного управления в организме человека с помощью внешнего магнитного поля. В настоящее время наиболее перспективным и многообещающим направлением является использование магнитных наночастиц в качестве вектора направленного транспорта антибиотиков и других лекарственных веществ [6, 12]. Основой этого метода является способность лекарственных препаратов, иммобилизованных на поверхности магнитных наночастиц, перемещаться и избирательно концентрироваться под воздействием внешнего магнитного поля в заданном участке организма.

Целью нашего исследования явилось изучение поведения магнитных наночастиц в эксперименте и их способности к переносу лекарств для дальнейшего использования в оториноларингологии.

Задачи научной работы

1. Оценить возможность направленного транспорта магнитных наночастиц с помощью внешнего магнитного поля.
2. Изучить цитотоксичность магнитных наночастиц.
3. Исследовать бактерицидную активность магнитных наночастиц в комплексе с антибиотиком.

Материалы и методы исследования

Магнитные наночастицы были получены в результате культивирования бактерий *Klebsiella oxytoca*, выделенных из сапропеля озера Боровое Красноярского края. Ранее выполненные исследования свидетельствовали о том, что в процессе жизнедеятельности бактерии синтезировали наночастицы минерала ферригидрита $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Ферригидрит относится к антиферромагнетикам. Вследствие малого размера частиц (2–7 нм) магнитные моменты ионов Fe^{3+} , находящиеся на поверхности частицы, оказываются некомпенсированными, и формируют «паразитный» интегральный магнитный момент отдельной частицы. Мессбауэровские параметры используемых в эксперименте наночастиц приведены в таблице 1.

Таблица 1

Мессбауэровские параметры наночастиц

	IS	H	QS	W	S	Принадлежность наночастиц
Исходные наночастицы	0.419	0	0.56	0.39	0.26	Fe1
	0.397	0	1.04	0.41	0.21	Fe2
	0.405	0	1.60	0.34	0.30	Fe3
	0.404	0	1.90	0.33	0.23	Fe4
Отожженные наночастицы.	0.373	517	-0.42	0.20	0.15	Fe_2O_3
	0.406	0	0.54	0.40	0.28	Fe1
	0.383	0	0.92	0.43	0.45	Fe2
	0.362	0	1.40	0.25	0.07	Fe3
	0.364	0	1.79	0.30	0.06	Fe4

Примечание: IS – изомерный химический сдвиг относительно ζFe , ± 0.01 мм/с.

QS – квадрупольное расщепление, ± 0.02 мм/с. W – ширина линии поглощения на полувысоте, ± 0.02 мм/с.

S – долевая заселенность позиции, ± 0.03 .



Как видно из таблицы 1, в исходных наночастицах обнаруживаются четыре неэквивалентные позиции трехвалентного железа. Все они принадлежат ферригидриту. Позиции Fe1 и Fe2 соответствуют позициям «идеальной» структуры ферригидрита, а позиции Fe3 и Fe4 относятся к дефектным позициям, возникающим в результате выхода катионов железа из слоев «идеальной» структуры. Отожженные наночастицы представляют собой ансамбль малых частиц дефектного ферригидрита, обладающих паразитным ферромагнитным моментом, и частиц гематита.

Для создания магнитного поля использовали аппарат «Полюс-101», который обеспечивал непрерывный режим работы одного индуктора с градиентом 4–6 мТл/мм и величиной магнитной индукции 10,14–19,56 мТл.

Материалом исследования явилась удаленная хрящевая и костная ткань перегородки носа 30 пациентов после ринохирургических вмешательств. Операции проводились в связи с нарушением функции носового дыхания, без признаков воспаления и других патологических состояний хрящевой и костной тканей носа.

Масса исследуемых магнитных наночастиц составляла 0,125 г. Магнитные порошки добавляли в 1 мл 0,9% раствора NaCl. Весь материал был равнозначно разделен на три серии (по 10 экспериментов в каждом).

В серии 1 кусочки хрящевой и костной ткани помещались в колбу с диспергированными в физиологическом растворе наночастицами на 20 минут, после чего промывались в физиологическом растворе и отправлялись на гистологическое исследование. В серии 2 и 3 кусочки хрящевой и костной ткани погружались в колбу с диспергированными наночастицами и выдерживались в магнитном поле, созданном аппаратом «Полюс-101» в течение 20 и 40 минут соответственно, после чего промывались в физиологическом растворе и отправлялись на гистологическое исследование. Для обнаружения наночастиц в тканях при гистологическом исследовании использовалась реакция Перлса (x100).

При изучении цитотоксичности магнитных наночастиц использовали реакцию хемилюминесценции (ХЛ). Основной реакции ХЛ является образование «дыхательного взрыва» при взаимодействии организма с чужеродным объектом. Интенсивность респираторного взрыва при фагоцитозе оценивали с помощью ХЛ. Хемилюминесцентный анализ проводился на нейтрофилах здоровых людей при воздействии на них магнитными наночастицами *in vitro*. Функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов крови изучалась по методу P. De Sole et al. (1983). Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3604». Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение (Imax), площадь кривой (S²). Регистрация результатов и управление хемилюминесцентным анализатором осуществлялась через микроЭВМ IBM/ PC/ AT.

Измеряли величину спонтанной ХЛ нейтрофилов, которая характеризует базальный уровень активации этих клеток. Для определения резервных возможностей активации нейтрофилов осуществляли стимуляцию кислородного метаболизма этих клеток посредством добавления к ним опсонизированного зимозана. Усиление ХЛ, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной ХЛ к площади спонтанной ХЛ и определяли как индекс активации (ИА).

В качестве усилителей люминесценции использовали люминол и люцигенин. Люминол-усиленная ХЛ регистрировала весь пул АФК и отражала суммарную активность миелопероксидазы и NADPH-оксидазы, а люцигенин-усиленная ХЛ измеряла образование супероксидного анион-радикала ($-\text{O}_2\dot{\text{I}}$) и оценивала активность NADPH – оксидазы.

При изучении бактерицидных свойств магнитных наночастиц, ассоциированных с антибиотиком, использовали полусинтетический пенициллин широкого спектра действия – ампициллин в дозе 250 мг. Исследование антибактериальной и бактерицидной активности магнитных наночастиц с ампициллином проводилось на средах, обсемененных *S. aureus* и *E. coli* в 10 опытах. Выделение микроорганизмов проводили на четырех питательных дифференциально-диагностических средах. Для выделения микрофлоры использовали кровяной агар, желточно-



солевой агар, Эндо и Энтерококкагар [2]. Посев проводили методом серийных разведений. Количество микроорганизмов подсчитывали по формуле Коха.

Для определения бактерий рода *Streptococcus* использовали тест на наличие каталазной активности. Каталазоотрицательные грамположительные кокки с кровяного агара пересеивали на стрептококковый бульон. Для идентификации стрептококков использовали тест систему «Slidex strepto-kit». Для идентификации бактерий семейства *Enterobacteriaceae* использовали агар Эндо. Для определения видов применяли биохимические пластины, дифференцирующие энтеробактерии ПБДЭ. Идентификация бактерий рода *Staphylococcus* проводилась по определителю Берджи, по стандартной микробиологической методике [8].

Результаты исследования

Как видно из рисунка 1, в серии 1 наночастицы не проникают в хрящевую ткань, а располагаются по краю хряща. Несмотря на относительно рыхлую структуру ткани хряща распространения наночастиц вглубь не происходило. Аналогичная картина была установлена и в костной ткани (рис. 2). Окрашенное нановещество располагалось в основном в просвете и вокруг костных каналов. В толщу костной ткани железосодержащее вещество не проникало.



Рис. 1. Гистологическая картина хрящевой ткани (серия 1). Реакция Перлса X100.

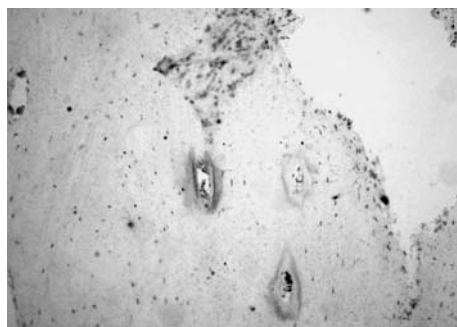


Рис. 2. Гистологическая картина костной ткани (серия 1). Реакция Перлса X100.

При воздействии на ткани магнитным полем в течение 20 минут (серия 2) активность железосодержащих наночастиц значительно усилилась (рис. 3, 4). Под действием градиента магнитного поля нановещества проникли в толщу хряща и кости. Распространение их в тканях происходило диффузно. Это можно объяснить тем, что межклеточное вещество хрящевой ткани перегородки носа состоит из основного аморфного вещества и коллагеновых волокон. То же самое было определено и в костной ткани, где проникновение наночастиц в костные пластинки осуществлялось практически на всем протяжении костных фрагментов. Распространение железосодержащего нановещества в толщу тканей подтверждает его магнитоактивность, и дает основание полагать, что им можно управлять с помощью магнитного поля.

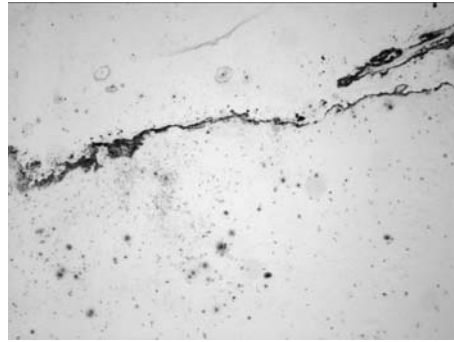


Рис. 3. Гистологическая картина хрящевой ткани (серия 2). Наличие железосодержащих наночастиц в толще хряща. Реакция Перлса X100.

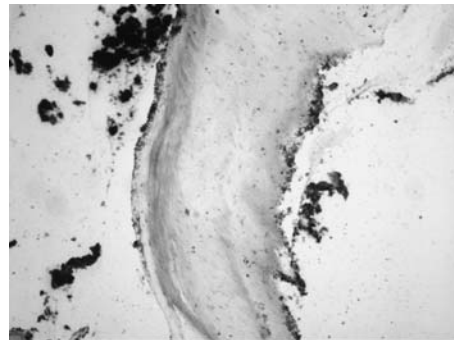


Рис. 4. Гистологическая картина костной ткани (серия 2). Наличие железосодержащих наночастиц в толще кости. Реакция Перлса X100.

Таким образом, на основании полученных данных выявлено, что магнитное воздействие на железосодержащие нановещества в течение 20 минут приводит к проникновению наночастиц в толщу хрящевой и костной тканей. Следует отметить и то, что, несмотря на увеличение времени магнитного воздействия вдвое в 3 серии эксперимента, заметного увеличения железосодержащего вещества в тканях не наступило.

При изучении цитотоксичности магнитных наночастиц было выявлено, что основные параметры ХЛ: время выхода на пик и площадь под кривой, в обоих опытах достоверно не различаются (табл. 2).

Таблица 2

Сравнительная оценка параметров хемилюминесценции

Группы	Параметры	Количество	Ср. значения
Контроль	Tmax_s_k	30	801,71
	Imax_s_k	30	18340,75
	S_s_k	30	0,55
Наночастицы	Tmax_s_k	30	790,13
	Imax_s_k	30	16645,63
	S_s_k	30	0,55

При зимозан-активированной ХЛ происходило синхронное усиление вышеуказанных критериев, как в опытах с наночастицами, так и в контроле (табл. 3).



Сравнительная оценка параметров хемилюминесценции

Группы	Параметры	Количество	Ср. значения
Контроль	Tmax_i_k	30	796,29
	Imax_i_k	30	25033,88
	ИА_k	30	1,35
Наночастицы	Tmax_i_k	30	792,83
	Imax_i_k	30	31573,75
	ИА_k	30	1,76

Таким образом, магнитные наночастицы не влияют на активность нейтрофилов, что свидетельствует об отсутствии у исследуемых частиц цитотоксического действия.

При изучении чувствительности *S. aureus* и *E. coli* к ампициллину с наночастицами в дозе 250мг выявлено отсутствие роста культуры во всех опытах так же, как и в контрольной группе.

Таким образом, на основании полученных данных мы пришли к следующим **выводам**:

1. Внешнее магнитное поле позволяет осуществлять направленный транспорт магнитных наночастиц в ткани.
2. Магнитные наночастицы не являются цитотоксичными.
3. Комплекс наночастица-антибиотик является стабильным и обладает бактерицидными свойствами.
4. Положительные результаты экспериментальных исследований магнитных наночастиц создали предпосылки для их дальнейшего изучения и использования в лечении различных заболеваний ЛОР-органов.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 08-08-00427 и РФФИ-ККФН 09-04-98038-р_сибирь_a.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. Е. Наноносители лекарственных веществ // Новая аптека. – 2003. – №1. – С. 64–67.
2. Зубков М. Н. Сбор биологического материала для бактериологического исследования // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – №2. – С. 144–148.
3. Кинетика и химиотерапевтическая активность некоторых антибиотиков, ассоциированных с наночастицами / С. А. Абдрахманов, С. Т. Байсагатов, А. Ю. Шерстов и др. // Астана мед. журналы. – 1999. – №4. – С. 84–98.
4. Нанотехнологии в хирургии: современное состояние вопроса и перспективы / В. И. Сороковой, П. Н. Лускинович, С. А. Панфилова и др. // Эндоскопич. хирургия. – 2002. – №1. – С. 22–30.
5. Наночастицы, как вектор направленного транспорта антибиотиков (обзор) / А. Е. Гуляев, Б. А. Еремекбаева, Г. Я. Кивман и др. // Хим.-фармацевтический журн. – 1998. – Т. 32, №3. – С. 3–5.
6. Никитин П. Н. Патент РФ №2166751, G01N27/12, 33/53, Бюл. №13, 10.05.2001 г.
7. Оптимизация фармакокинетики препарата «Фотосенс» с помощью биодеградирующих наночастиц / И. Н. Скидан, А. И. Бобрускин, А. Е. Гуляев и др. // Антибиот. и химиотерапия. – 2001. – Т. 46, №4. – С. 6–9.
8. Хоулт Дж. Берджи. Определитель бактерий / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит и др. – М.: Мир, 1997. – Т. 2. – 799 с.
9. Gupta AK. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications / AK Gupta, M Gupta // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26, №18. – P. 3995–4021.
10. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine / E. Duguet, S. Vasseur, S. Mornet et al. // Nanomed. – 2006. – Vol. 1, №2. – P. 157–168.
11. Medical applications of magnetic nanoparticles / C Alexiou, R Jurgons, C Seliger et al. // J Nanosci Nanotechnol. – 2006. – Vol. 6, №9–10. – P. 2762–2768.
12. Molecular composition of iron oxide nanoparticles, precursors for magnetic drug targeting, as characterized by confocal Raman microspectroscopy / I Chourpa, L Douziech-Eyrolles, L. Ngaboni-Okassa, et al. // Analyst. – 2005. – Vol. 130, №10. – P. 1395–1403.