

УДК 615.099.092

Получение наночастиц палладия и оценка их влияния на клетки перитонеальной полости мышей C57Bl/6

Филиппов А.Г.

ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН;
Москва, 125315, Балтийская ул., д.8

Получены препараты наночастиц палладия с использованием аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя и гидроксиэтилцеллюлозы в качестве стабилизатора приемлемые для биомедицинских исследований. В модели *in vivo* на мышах C57Bl/6 показано дозо-зависимое влияние наночастиц палладия на клетки иммунной системы. Полученные данным методом наночастицы палладия в концентрации до 10 мкМ в связи с отсутствием токсичности могут быть использованы в биологических системах.

Ключевые слова: наночастицы палладия, токсичность, нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги, мыши, наномедицина

Введение

В настоящее время активно ведутся работы по использованию наночастиц металлов в биологических и медицинских исследованиях. Например, в противоопухолевой терапии в качестве радиосенсибилизаторов, средств направленной доставки цитостатиков [10], фотосенсибилизаторов [5] и т.д. При этом среди металлов, наночастицы которых вызывают наибольший интерес (золото, серебро, палладий), только палладий пока мало изучен [4]; исследовались только комплексные соединения палладия с противоопухолевой активностью, например, отечественный экспериментальный препарат морфозол [1]. В связи с этим возникла потребность подробного изучения биологических эффектов именно наночастиц палладия (Pd-НЧ). Кроме того, Pd-НЧ широко используются в производстве катализаторов [2], в том числе автомобильных [11], что приводит к загрязнению окружающей среды и вызывает потребность изучения токсического действия наночастиц палладия [14].

Существуют различные методы синтеза Pd-НЧ, принципиально заключающиеся в восстановлении солей палладия в растворе с одновременной стабилизацией образующихся частиц. В качестве восстановителей используют молекулярный водород [12], боргидрид натрия, гидразин [6], а также спирты, соли винной кислоты [13], сахара [9], а стабилизаторами служат разнообразные полимеры. Однако получаемые растворы Pd-НЧ не всегда пригодны для изучения биологического эффекта нанопалладия. Причиной этому являются: наличие в растворе помимо наночастиц невосстановленных ионов металла, продуктов окисления восстановителя, его избытка, стабилизатора; нередко использование в синтезе токсичных восстановителей и поверхностно-активных веществ; агрегативная неустойчивость наночастиц в солевых средах.

Целью работы являлось:

- 1) получение растворов Pd-НЧ, пригодных для изучения биологических эффектов нанопалладия;
- 2) изучение биологического эффекта полученных наночастиц в экспериментах *in vivo* на мышах.

Объект, материалы и методы исследования

Получение препарата наночастиц палладия

Раствор Pd-НЧ получали по следующей методике. Навеску 7 мг хлорида палладия (II) растворяли в 2 мл физиологического раствора при нагревании до 50°C, приливали 18 мл дистиллированной воды (H₂Odest), отбирали 5 мл, вносили в стакан на 150 мл и разбавляли H₂Odest до 20 мл. При интенсивном перемешивании на магнитной мешалке (MMS-3000, Biosan) в полученный раствор вносили 1 мл водного раствора гидроксиэтилцеллюлозы (ГЭЦ) в концентрации 5 мг/мл. Далее по каплям добавляли 2 мл водного раствора аскорбиновой кислоты в концентрации 7 мг/мл. Происходило изменение окраски со светло-желтой на серо-коричневую. Раствор продолжали перемешивать 0,5 ч и оставляли на 12 ч при комнатной температуре.

Для биомедицинских приложений Pd-НЧ необходимо, чтобы в водном растворе наночастиц отсутствовали продукты окисления восстановителя и невосстановленные ионы металла. Для этого Pd-НЧ отделяли от маточного раствора ультрацентрифугированием. Полученный раствор Pd-НЧ разбавляли в 3 раза H₂Odest и центрифугировали (ультрацентрифуга Optima™ L-90K Beckman Coulter, Inc.) при 41 000 г в течение 20 мин, супернатант сливали, осадок ресуспендировали в H₂Odest и повторно центрифугировали при 10 000 г 20 мин, после чего осадок ресуспендировали в физиологическом растворе.

Полученные Pd-НЧ характеризовали посредством просвечивающей электронной микроскопии на приборе LEO 912 AB OMEGA OMEGA (Carl Zeiss SMT AG Oberkochen, Германия). (Мы благодарим доцента МГУ им. М.В. Ломоносова С.С. Абрамчука за помощь в проведении электронной микроскопии и предоставление микрофотографий).

Для этого на медную сеточку, покрытую углеродной пленкой, наносилась капля раствора наночастиц, которая высыхала на воздухе. Электронные микрофотографии позволяли оценить форму и средний размер наночастиц. Образование фазы металла подтверждали электронно-дифракционным исследованием.

УФ-видимые спектры растворов Pd-НЧ регистрировались на приборе Lambda EZ201 (Perkin—Elmer, США). На УФ-видимых спектрах растворов наблюдалась типичная для водных растворов Pd-НЧ широкая полоса поглощения без ярко выраженного максимума, со спадающей интенсивностью от 200 до 650 нм.

Модельный эксперимент на животных

Для изучения биологического действия раствора Pd-НЧ использовали 60 самцов мышей пород C57Bl/6/ВМ1. В ходе эксперимента мышам внутривенно вводили по 0,5 мл физиологического раствора с Pd-НЧ в заданной концентрации (0,1; 10; 100 мкМ). В контрольном эксперименте вводили 0,5 мл физиологического раствора. Время воздействия Pd-НЧ определялось ранее выбранным временем (3 ч), при котором в нашем эксперименте достоверно можно увидеть биологическую эффективность препаратов и различия в популяциях и субпопуляциях клеток перитонеального экссудата. Через 3 ч мышам декапитировали, что позволяло максимально обескровить мышь и избежать попадания эритроцитов в перитонеальный экссудат, оголяли брюшную стенку и в течение одной минуты промывали брюшную полость стерильным физиологическим раствором, отсасывали шприцом перитонеальный экссудат и сразу переносили его в 4%-ный раствор параформальдегида на фосфатном буфере. Далее полученный раствор центрифугировали при 200 g в течение 10 мин, супернатант сливали, осадок встряхивали и к нему добавляли 2% параформальдегид в физиологическом растворе, что позволяло хранить клетки при 4°C в холодильнике до исследования их на проточном цитофлуориметре. Полученный препарат анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACS Calibur, (Becton Dickinson Ltd, США). За 15 мин перед исследованием суспензию клеток окрашивали раствором пропидиума йодида PI (1 мкг/млн клеток) в гипотоническом буфере (0,1% цитрат натрия, 0,1% тритон X-100 на H₂Odest). Такая методика позволяет PI легко проникать во все клетки, как в мертвые, так и в живые, и таким образом окрашивать диплоидные, апоптотные и делящиеся клетки, интеркалируя в двойную спираль ДНК. Клетки перитонеальной полости также были фенотипированы на экспрессию специфических маркеров, идентифицирующих основные популяции клеток, т.е. нейтрофилы (Ly6G⁺), лимфоциты (CD3⁺ Т-лимфоциты и CD19⁺ В-лимфоциты) и макрофаги (F4/80⁺) (все антитела фирмы BD Biosciences). Окраска клеток проводилась по стандартной методике фирмы.

Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопическое исследование полученных растворов наночастиц, показало бимодальное распределение частиц по размерам с преобладанием двух популяций 4—10 нм и 20—22 нм (рис. 1А). Отметим, что, несмотря на произвольную геометрию, электронная микрофотография в темном поле показала монокристалличность полученных наночастиц.

Картина дифракции электронов (рис. 1Б) отвечала гранецентрированной кубической решетке, подтверждая образование фазы металлического палладия, при этом отсутствие посторонних рефлексов, не укладывающихся на дифракционные кольца, отвечающие ГЦК-решетке пал-

ладия, указывало на отсутствие кристаллов оксида палладия, солей палладия.

Таким образом, по методу, требующему использования нетоксичных реагентов, были синтезированы Pd-НЧ, пригодные для дальнейшего изучения биологических эффектов.

Для выявления биологических эффектов Pd-НЧ были проанализированы данные, полученные при изучении клеток перитонеального экссудата методом проточной цитофлуориметрии. На полученной картине распределения клеток перитонеального экссудата в системе координат FSC (прямое светорассеяние) / SSC (боковое светорассеяние) (рис. 2) можно идентифицировать основные популяции: лимфоцитов, нейтрофилов, макрофагов и апоптотные клетки, дедрис, которые представлены в виде гейтов R1, R2, R3 и R4 соответственно.

Воздействие Pd-НЧ в минимальной концентрации 0,1 мкМ вызывало по сравнению с контролем (рис. 2) уменьшение числа клеток в гейте Т-лимфоцитов (гейт R1B, рис. 3 А2, табл. 1) и рост числа клеток в гейте В-лимфоцитов (гейт R1A, рис. 3 А2, табл. 1). По сравнению с контролем изменения в гейте лимфоцитов также характеризуются расширением верхней области гейта

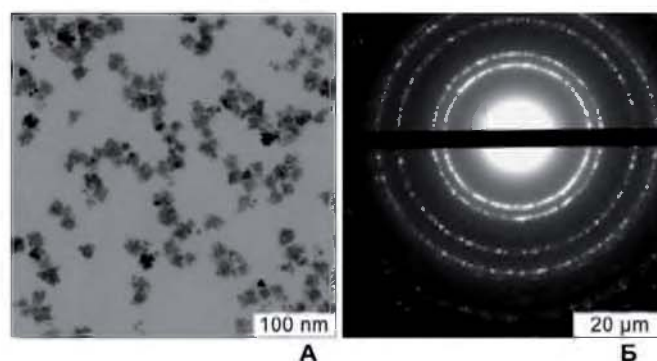


Рис. 1. Электронные микрофотографии Pd-НЧ стабилизированных ГЭЦ (А); электронно-дифракционная картина Pd-НЧ (Б).

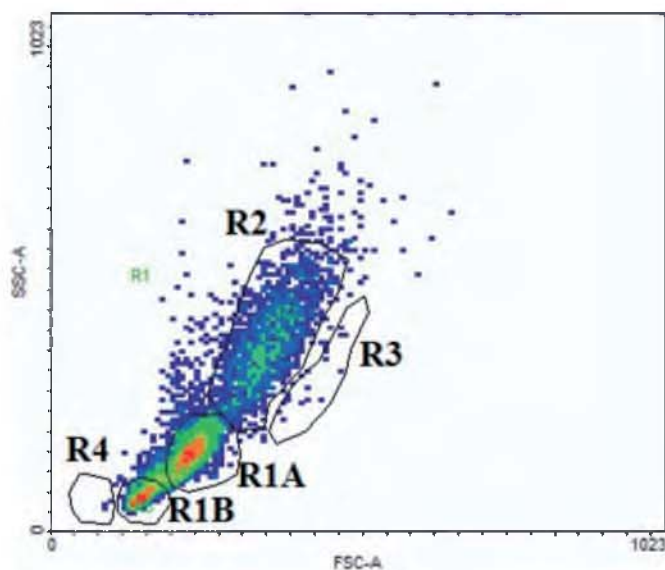


Рис. 2. Типичная картина распределения клеток перитонеального экссудата в координатах FSC/SSC в контрольном эксперименте. Гейт R1A соответствует В-лимфоцитам; R1B – Т-лимфоцитам; R2 – нейтрофилам; R3 – макрофагам; R4 – апоптотическим клеткам, дедри-

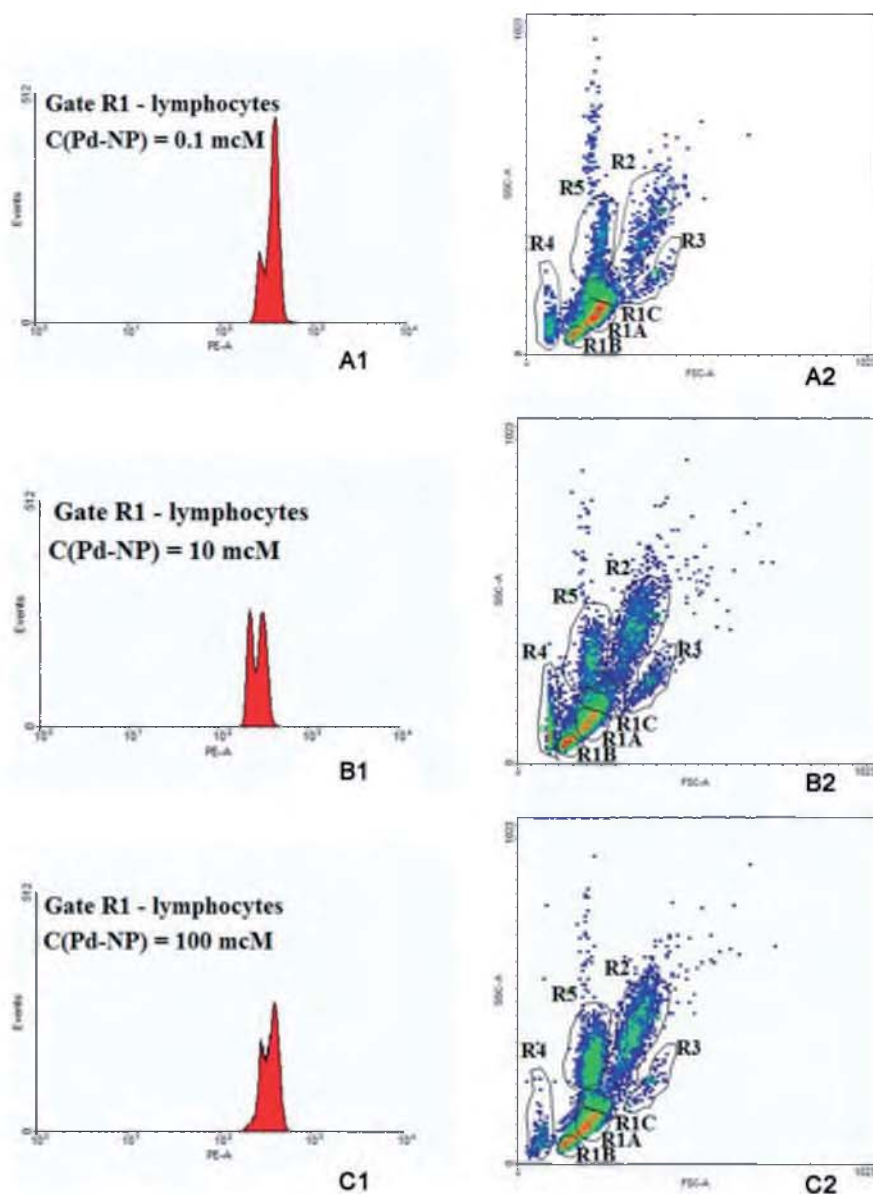


Рис. 3. Гистограммы гейта лимфоцитов по каналу PE-A и картина распределения гейтов клеток перитонеального экссудата в координатах FSC/SSC. Воздействие дисперсии Pd-НЧ в концентрации: А – 0,1 мкМ; В – 10 мкМ; С – 100 мкМ. Гейт R1 соответствует лимфоцитам (R1A – бласты, R1B – В-лимфоциты, R1C – Т-лимфоциты); R2 – нейтрофилам; R3 – макрофагам; R4 – апоптозным клеткам, детрису; R5 – погибшим нейтрофилам. Распределение клеток показывает приток нейтрофилов и их прогрессирующую гибель, а гистограмма – истощение гейта лимфоцитов с ростом концентрации Pd-НЧ.

(гейт R1C, рис. 3 A2), относимой к бластам. При увеличении концентрации Pd-НЧ до 10 мкМ происходило уменьшение числа бластов (гейт R1C, рис. 3 B2, табл. 1), уменьшение числа В-клеток (гейт R1A, рис. 3 B2, табл. 1). В целом, наблюдается истощение гейта лимфоцитов (рис. 3 B1, табл. 2). Таким образом, можно отметить некоторое стимулирующее действие Pd-НЧ на лимфоциты в малой дозе и токсическое – в большой.

Воздействие Pd-НЧ в минимальной концентрации 0,1 мкМ приводило к появлению нового гейта, расположенного левее гейта нейтрофилов и идентифицируемого как гейт погибших нейтрофилов (гейт R5, рис. 3 A2). Воздействие Pd-НЧ в концентрации 100 мкМ приводит к росту числа нейтрофилов (рис. 4B) за счет их притока в перитонеальную полость наряду с их гибелью.

Причинами токсического действия Pd-НЧ могут быть индуцирование окислительного стресса через электрока-

талитическую генерацию активных форм кислорода на поверхности наночастиц [8], повреждение наночастицами мембран митохондрий, по аналогии с действием наночастиц других благородных металлов [3]. Косвенным подтверждением последнего является преимущественно токсическое действие на нейтрофилы, которые являются наиболее чувствительными клетками к окислительному стрессу [7] и содержат максимальное число митохондрий. Токсическое влияние может также оказать стабилизатор, остающийся в небольшом количестве адсорбированными на поверхности наночастиц.

Таким образом, были изучено биологическое действие Pd-НЧ на клетки иммунной системы в модели *in vivo* на мышах. Показано токсическое действие Pd-НЧ в концентрации более 10 мкМ преимущественно на нейтрофилы, раствор Pd-НЧ в концентрации 0,1 мкМ токсического действия на клетки иммунной системы не проявлял.

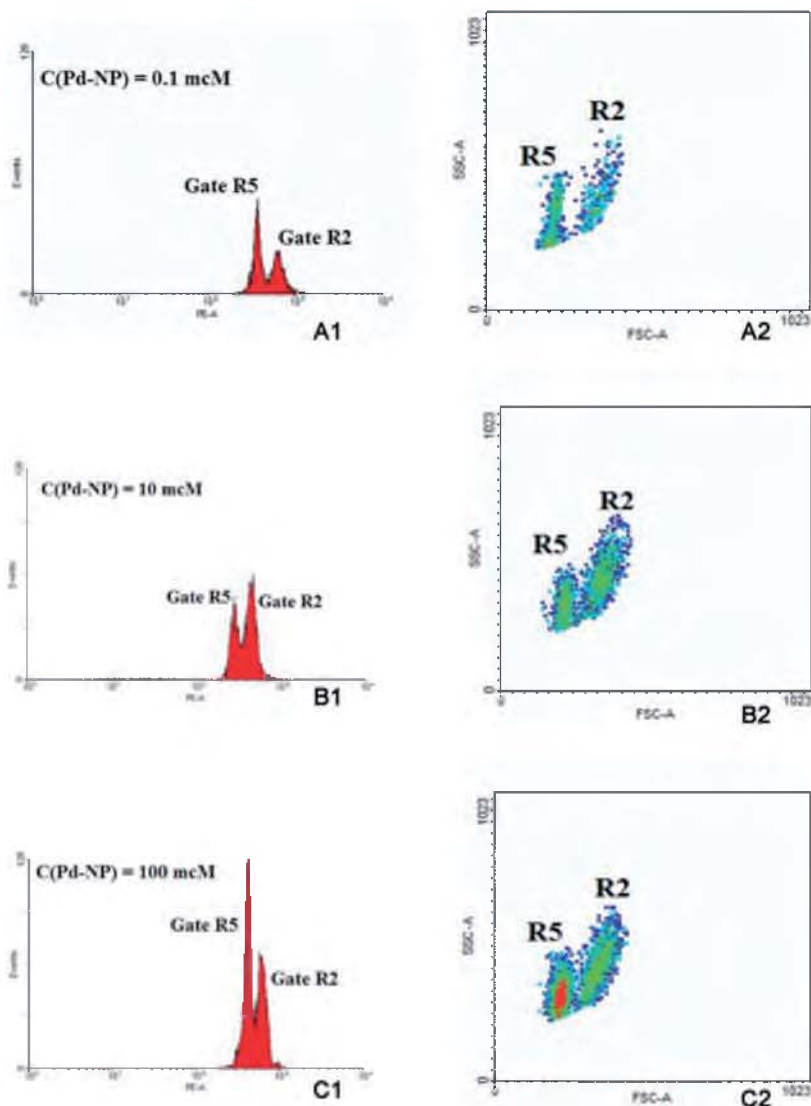


Рис. 4. Гистограммы гейтов нейтрофилов R2 и погибших нейтрофилов R5 по каналу PE-A и картина распределения этих клеток перитонеального экссудата в координатах FSC/SSC. Воздействие дисперсии Pd-НЧ в концентрации: А – 0,1 мкМ; В – 10 мкМ; С – 100 мкМ. Распределение клеток и гистограмма показывает приток нейтрофилов и прогрессирующую их гибель с ростом концентрации Pd-НЧ.

Таблица 1

Относительное содержание (% от общего числа клеток) различных популяций лимфоцитов перитонеального экссудата при действии Pd-НЧ различной концентрации и в контроле

Pd-НЧ, концентрация, мкМ	В-лимфоциты. Гейт R1A	Т-лимфоциты. Гейт R1B	Бласты. Гейт R1C
Контроль	44 ± 2	27 ± 1	3 ± 0,2
0,1	55 ± 3	17 ± 1	9 ± 0,5
10	31 ± 2	26 ± 1	5 ± 0,3
100	39 ± 2	19 ± 1	5 ± 0,3

Таблица 2

Относительное содержание (% от общего числа клеток) различных популяций клеток перитонеального экссудата при действии Pd-НЧ различной концентрации и в контроле

Pd-НЧ, концентрация, мкМ	Лимфоциты. Гейт R1	Нейтрофилы. Гейт R2	Погибшие нейтрофилы. Гейт R5	Макрофаги. Гейт R3
Контроль	75 ± 4	14 ± 1	0	2 ± 0,1
100	65 ± 3	12 ± 1	13 ± 1	1 ± 0,1
10	63 ± 3	9 ± 1	5 ± 0,3	2 ± 0,1
0,1	76 ± 4	4 ± 0,2	8 ± 0,4	1 ± 0,1

Список литературы

1. Горбачева Л.Б., Тихомиров А.Г., Дедерер Л.Ю., Иванова Н.А., Ерофеева О.С., Очерянова Л.И., Ефименко И.А. Новый противоопухолевый препарат морфозол: внутриклеточное распределение и влияние на синтез ДНК // Химико-фармацевт. журн. — 2008. — В. 2. — С. 3–5.
2. Губин С.П. Наночастицы палладия // Рос. хим. ж. — 2004. — В. 4. — С. 46–54.
3. Филиппов А.Г., Капун А.П., Кубатиев А.А. Получение наночастиц серебра с использованием полифенолов и оценка их влияния на клетки перитонеальной полости мышей C57BL/6 *in vivo* // Патогенез. — 2013. — Т. 11, №4. — С. 59–63.
4. Boscolo P., Bellante V., Leopold K., Maier M., Di Giampaolo L., Antonucci A., Iavicoli I., Tobia L., Paoletti A., Montalti M., Petrarca C., Qiao N., Sabbioni E., Di Gioacchino M. Effects of palladium nanoparticles on the cytokine release from peripheral blood mononuclear cells of non-atopic women // J. Biol. Reg. Homeos. AG. — 2010. — Vol. 24. — Iss. 2. — P. 207–214.
5. Chatterjee D. K., Fong L. S., Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm // Advanced Drug Delivery Reviews. 2008. — Vol. 60. — P. 1627–1637.
6. Ganesan M., Ruel G., Freemantle, Sherine O. Obare. Monodisperse Thioether-Stabilized Palladium Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Reactivity // Chem. Mater. — 2007. — Vol. 19. — P. 3464–3471.
7. Maianski N.A., Kuijpers T.W., Roos D. Apoptosis of Neutrophils // Acta Haematol. — 2004. — Vol. 111, №1–2. — P. 56–66.
8. Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel // Science. — 2006. — Vol. 311. — P. 622–627.
9. Panigrahi S., Kundu S., Ghosh K.S., Nath S., Pal T. General method of synthesis for metal nanoparticles // J. Nanopart. Res. — 2004. — Vol. 6. — P. 411–414.
10. Praetorius N.P., Mandal T.K. Engineered Nanoparticles in Cancer Therapy // Recent Pat. Drug Deliv. Formul. — 2007. — Vol. 1. — P. 35–51.
11. Rauch S., Hemond H.F., Barbante C., Owari M., Morrison G.M., Peucker-Ehrenbrink B., Wass U. Importance of automobile exhaust catalyst emissions for the deposition of platinum, palladium, and rhodium in the northern hemisphere // Environ. Sci. Technol. — 2005. — Vol. 39. — P. 8156–8162.
12. Schlotterbeck U. Shape-selective synthesis of palladium nanoparticles stabilized by highly branched amphiphilic polymers // Adv. Funct. Mater. — 2004. — Vol. 14. — Iss. 9. — P. 999–1004.
13. Tan Y., Dai X., Li Y., Zhu D. Preparation of gold, platinum, palladium and silver nanoparticles by the reduction of their salts with a weak reductant-potassium bitartrate // J. Mater. Chem. — 2003. — Vol. 13. — P. 1069–1075.
14. Wilkinson K.E., Palmberg L., Witasz E., Kupczyk M., Feilich N., Gerde P., Seisenbaeva G.A., Fadeel B., Dahlen S.-E., Kessler V.G. Solution-engineered palladium nanoparticles: model for health effect studies of automotive particulate pollution // ACS Nano. — 2011. — Vol. 5, №7. — P. 5312–5324.

Поступила 8.12.2013

**Palladium nanoparticle synthesis
and an estimation of these effects *in vivo*
on the peritoneal cells from the male mouse C57BL/6**

Philippov A.G.

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS,
8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315

The palladium nanoparticles (Pd-NPs) have been prepared using the ascorbic acid as the reducing agent and the hydroxyethylcellulose as a stabilizing agent. The Pd-NPs forms and sizes were evaluated using a transmission electron microscopy. In vivo biological effects of these Pd-NPs were estimated using the male mouse C57BL/6. The Pd-NPs [10–500 μM] have been injected intraperitoneally for 3 hours followed by a quantitative analysis of the peritoneal cells using the flow cytometer. The dose-dependent effects of these Pd-NPs have been registered. The Pd-NPs in the concentration ≤ 10 μM possess the immune modulatory effects and were not been toxic that allows us to use these Pd-NPs in the future work with the biological systems.

Key words: palladium nanoparticles, toxicity, lymphocytes, macrophages, ascorbic acid, hydroxyethylcellulose, mouse, nanomedicine