

Рисунок 60 - Изменение дыхательной активности перитонеальных клеток крыс в присутствии конъюгатов коллоидного селена

Отметив дыхательную активность клеток селезенки, мы провели изучение влияния нашего препарата на дыхательную активность фагоцитирующих клеток, в частности, перитонеальных клеток крыс. На рисунке 60 можно отметить, что дыхательная активность перитонеальных клеток возрастает в присутствии нашего препарата в 10 раз, что может указывать на способность селена активировать клеточную активность.

Заключение. Анализируя полученные данные, хочется отметить, что данный комплекс обладает ярко выраженными иммуномодулирующими свойствами, что в дальнейшем позволит создать препараты, обладающие высокой биологической активностью и низкой токсичностью, и даст возможность провести конструирование иммуномодулирующих и вакцинных препаратов.

Литература. 1. Miedzobrodzki J., Naidu A. S., Watts J.L., Ciborowski P., Palm K., Wadsröm T. Effect of milk on fibronectin and collagen type I binding to *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis // J. Clin. Microbiol. 1989. V. 27. P. 540-544. 2. Miyauchi H., Kaino A., Shinoda I., Fukuwatari Y., Hayasawa H. Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate on murine splenocytes and Peyer's patch cells // J. Dairy Sci. 1997. V. 80. P. 2330-2339. 3. Holmgren J., Svennerholm A.M., Ahren C. Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion (hemagglutination) and enterotoxin binding of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* // Infect. Immun. 1981. V. 33. P. 136-141. 4. Dionysius D.A., Milne J.M. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization // J. Dairy. Sci. 1997. V. 80. P. 667-674. 5. Dionysius D.A., Grieve P.A., Milne J.M. Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli* // J. Dairy Sci. 1993. V. 76. P. 2597-2606. 6. Naidu A.S. Lactoferrin: Natural, Multifunctional, Antimicrobial. - Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. 86 p. 7. Zimecki M., Mazurier J., Machnicki M., Wieczorek Z., Montreuil J., Spik G. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murine thymocytes // Immunol. Lett. 1991. V. 30. P. 119-124.

Статья передана в печать 04.01.2013г.

УДК 619:636.09:633.88

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОЛЛОИДНОГО СЕЛЕНА В КАЧЕСТВЕ НАНОРАЗМЕРНОГО СРЕДСТВА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ

*Исаева А.Ю., **** Староверов С. А., *Волков А. А., **** Субботин А.М., ** Козлов С. В.
 *ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова»,
 ** Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН,
 *** Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов,
 **** УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
 Республика Беларусь, г. Витебск

В работе было выполнено конструирование наноразмерной частицы на основе селена и определены ее основные физико-химические.

The work contains results of construction of the nanopart on the basis of selenium. Its physico-chemical and biological features were estimated and determined as well.

Введение. Одной из важнейших проблем в фармацевтической отрасли остается адресная доставка лекарственных веществ, предназначенная для повышения эффективности лечения. Как известно, традиционные лекарственные формы содержат одно или несколько индивидуальных лекарственных веществ в формах, пригодных для энтерального или парентерального введения. Применяемые подходы к введению лекарств в организм человека и животных, основанные на использовании общепринятых лекарственных форм, имеют целый ряд существенных недостатков:

- повышенный расход лекарственных веществ, вызванный тем, что лекарственное вещество не достигает всех необходимых биологических мишеней или достигает, но в концентрации значительно меньшей по сравнению с необходимой терапевтической;

- ненаправленное действие лекарственного вещества, т.е. взаимодействие с нецелевыми биообъектами, часто приводит к побочным эффектам, обусловленным его метаболитами, и к нецелевому, иррациональному расходу лекарственного средства;

- невозможность поддержания оптимальной терапевтической концентрации лекарственного вещества в течение необходимого времени и, как следствие, необходимость частого приема лекарственного препарата;

- недостаточная биосовместимость и нежелательные физиологические эффекты в области введения лекарственных средств. Необходимость использования специальных методик введения лекарственного препарата;

- значительные трудности в использовании лекарственных веществ с неоптимальными транспортными свойствами (например, высокая липофильность).

Наиболее ярко перечисленные недостатки проявляются при использовании лекарственных веществ с выраженным побочным действием (большинство противоопухолевых препаратов), а также лекарств, действующих на центральную нервную систему: наркотические анальгетики, средства лечения болезни Альцгеймера и др., т.е. лекарственных агентов, действие которых требует преодоления гематоэнцефалического барьера.

Цель данного исследования: изучение возможности использования коллоидного селена в качестве наноразмерного средства внутриклеточной доставки биоактивных веществ и антигенов во внутриклеточное пространство.

Материалы и методы исследований. Коллоидный селен синтезировался нами по методу Bo Huang et al (2003).

Использованные в работе культуры клеток эмбрионов свиньи (SPEV) получены из криобанка коллекции клеточных культур лаборатории вирусологии научно-исследовательского ветеринарного института Российской академии сельскохозяйственных наук (РАСХН) (Саратов). Культивирование клеточных культур проводили в пластиковых флаконах в полной RPMI среде (10% эмбриональной сыворотки, гентамицин, ампициллин, амфотерицин) при 37° С. Диссоциация клеток монослойной культуры достигалась промыванием монослоя раствором трипсина в течение 10 мин.

При изучении взаимодействия коллоидного селена с клетками к 1 мл клеточной суспензии с количеством клеток $1 \cdot 10^8 - 10^9$ вносится 0,5 конъюгат селена с лактоферрином с концентрацией белка 1 мг на мл переработанный в полной среде и 1 мл среды. Ставится на ночь в термостат 37°С.

Электронную микроскопию осуществляли на электронном микроскопе LIBRA 120 (Carl Zeiss, Германия). Микроскопию проводили на микроскопе Leica DM 2500 с использованием режимов фазового контраста, темного поля, флуоресценции. Эффект темного поля достигался за счет бокового освещения препарата осветителем Leica CLS. Захват и анализ изображения достигается с помощью цифровой FireWire видеокамеры Leica DFC420C и программы Leica Application Suite.

Результаты. Мы решили использовать селен как наноразмерное средство внутриклеточной доставки, опираясь на предположение, что данный элемент имеет определенное преимущество перед другими носителями, связанное с тем, что сам коллоидный селен является частью метаболической цепочки организма и, вполне вероятно, может усваиваться во внутриклеточном пространстве. Тем самым мы убираем нежелательные последствия, связанные с «утилизацией» организмом самого наноносителя.

Проведя синтез полученной нами частицы, мы провели изучение ее размера при помощи электронной микроскопии и установили, что размер частиц полученного нами препарата колеблется в диапазоне от 40 до 100 нм (рисунок 61).

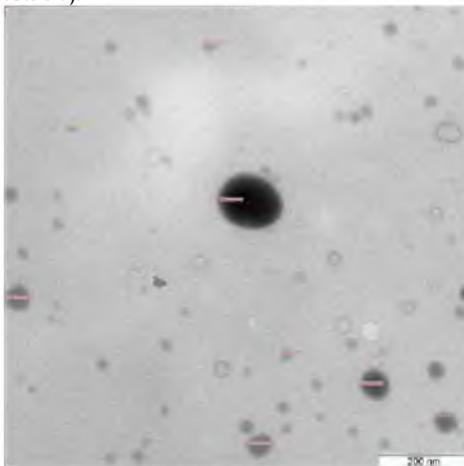


Рисунок 61 - Электронная микроскопия образцов полученного препарата коллоидного селена

Предварительное изучение созданного нами препарата с биологическими объектами проводили на клетках линии HeLa. Данные по взаимодействию частиц с клетками приведены на рисунках 2; 3.

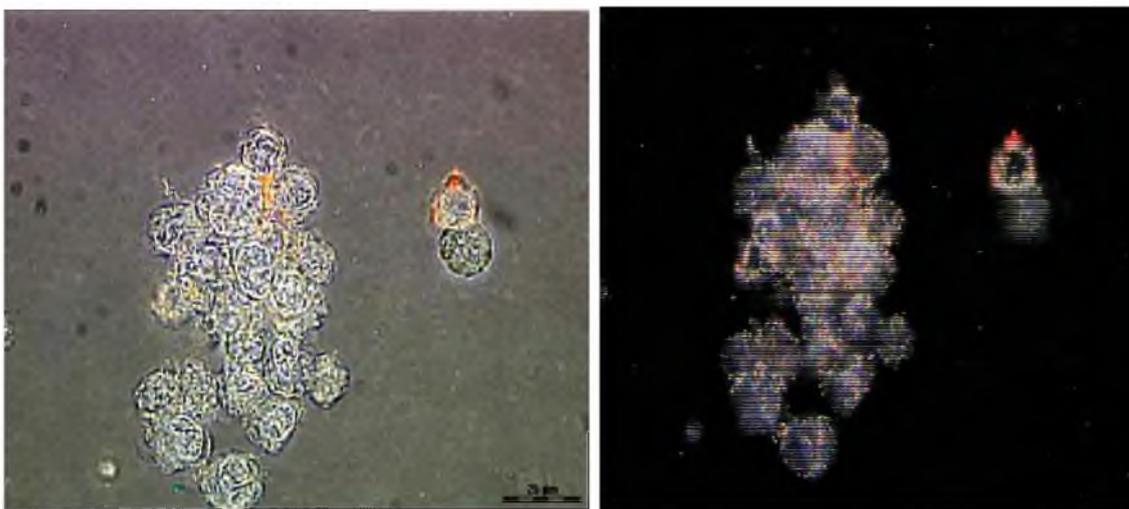


Рисунок 62 - Микроскопия образцов в проходящем и отраженном свете

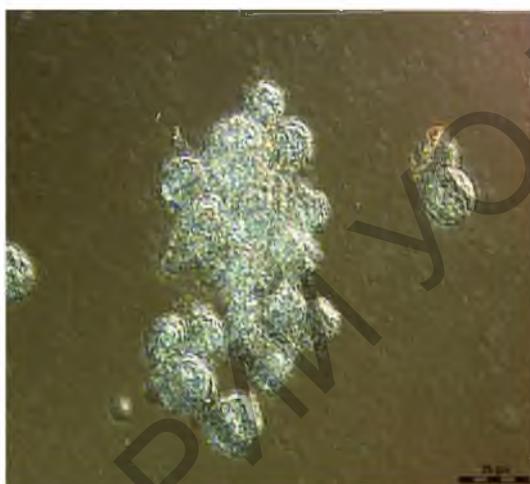


Рисунок 63 - Микроскопия образцов с использованием объективов DIC

На всех фотографиях видно оранжевое свечение, что является включением селена в клетках и соответственно свидетельствует о проникновении препарата через клеточную мембрану.

Заключение.

1. Коллоидный селен представляет собой наночастицы размером от 40 до 100 нм;
2. Коллоидный селен свободно проникает через клеточную мембрану и накапливается во внутриклеточном пространстве;
3. Наночастицы селена могут использоваться в качестве наноразмерного средства внутриклеточной доставки биоактивных веществ и антигенов во внутриклеточное пространство.

Литература. 1. Авцин А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. //Микроэлементозы человека. М., 1991. С. 196-202 2. Мурах В. И., Коломиец Н. Д., Петрова В. С., Гриц М. А., Мойсеев А. Г. Роль селена в организме животного и человека //Весті нацыянальнай акадэміі навук беларусі № 3 2002 Серыя біялагічных навук С. 99-105 3. Jia X., Li N., Chen J. A subchronic toxicity study of elemental Nano-Se in Sprague-Dawley rats // Life Sci. 2005;76(17):1989-2003 4. Dungeng Peng, Jinsong Zhang, QingliangLiu, Ethan Will Taylor Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity // Journal of Inorganic Biochemistry 2007 Volume 101, No 10, P. 1457-1463 5. о Huang, Jinsong Zhang, Jingwu Hou, and Chang Chen Free radical scavenging efficiency of nano-Se in vitro //Free Radical Biology & Medicine.-2003.-Vol.-35.-No. 7.-pp.805-813 6. Jinsong Zhang, Xufang Wang and Tongwen Xu Elemental Seleniumat Nano Size (Nano-Se) as a Potential emopreventive Agent with Reduced Risk of Selenium Toxicity: Comparison with Se-Methylselenocysteine in Mice // Toxicological Sciences 101(1),22-31(2008) 7. Фримель Г. Иммунологические методы. -М.: Медицина, 1987, -472 с. 8. Bemis T., Dobrucki J.W. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 380. P. 108-116 8. Bo Huang, Jinsong Zhang, Jingwu Hou, and Chang Chen Free radical scavenging efficiency of nano-Se in vitro // Free Radical Biology & Medicine.- 2003.-Vol.-35.-No. 7.-pp.805-813, 9. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вухоть Н.Е. Иммунология: Практикум. - Киев: Вища шк., 1989. 10. Michael V. Berridge, An S. Tan, Kathy D. McCoy, Rui Wang The Biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts // Biochemica.- 1996.-№. 4.-p.14-19 11. Кузакова Н. А., Самойлова Е. О., Моловская Л. Д. Оценка пролиферативной активности лимфоцитов в МТТ-тесте // Инструкция к применению «МинЗдрав Республика Беларусь.-2002.-6 стр.

Статья передана в печать 04.01.2013г.