

И.В. Мильто^{1,2}, И.В. Суходоло²

¹ ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, Томск
² ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Структура печени, легкого, почек, сердца и селезенки крыс после многократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита

Изучено влияние многократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита на структуру печени, легких, почек, сердца и селезенки крыс в различные сроки. Гистологическое исследование выявило гемодинамические расстройства и некротические изменения паренхимы этих органов. Значительное накопление наноразмерных частиц магнетита в клетках системы мононуклеарных фагоцитов печени, легкого и селезенки крыс продемонстрировано гистохимическим методом Перлса. В почках и сердце крыс обнаружены лишь единичные Перлс-позитивные клетки.

Ключевые слова: наноразмерные частицы магнетита, гистология внутренних органов.

Введение

В последние годы отмечается интерес к новому классу материалов — наноматериалам. К настоящему моменту создано и изучается большое количество различных наноструктур. Широкое распространение получили наноматериалы неорганического происхождения, в том числе наноразмерные частицы оксида железа. Наличие уникальных свойств у наноразмерных частиц магнетита открывает перспективы для их биомедицинского приложения. Несмотря на широкое экспериментальное изучение наноразмерных частиц, все еще нет однозначных представлений о механизмах их фармакокинетики и возможных негативных эффектах. Мало изучены отдаленные последствия парентерального введения наноматериала [1–5].

Цель работы: изучить влияние многократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита на структуру печени, легкого, почек, сердца и селезенки у крыс в различные сроки.

Экспериментальная часть

Исследование проводилось на 60 беспородных крысах-самцах массой 150 ± 30 г, из которых были сформированы 3 группы: 1-я (20 крыс) — интактные животные; 2-я (20 крыс) — многократное (каждые двое суток по 2 мл в хвостовую вену) введение стабилизирующего раствора; 3-я (20 крыс) — многократное (каждые двое суток по 2 мл в хвостовую вену) введение стабилизированной суспензии магнетита ($0,1$ г (Fe_3O_4) /кг массы тела).

За период наблюдения спонтанной гибели животных не отмечалось.

Выведение животных из эксперимента проводили методом декапитации под эфирным наркозом через 7, 14, 21 и 40 суток после инъекции; взятие материала у животных всех групп производили в одни и те же сроки. Для исследования брали печень, легкое, почки, сердце и селезенку животных.

Проводку и заливку в парафин материала для гистологического и гистохимического исследований осуществ-

I.V. Milto^{1,2}, I.V. Sukhodolo²

¹ State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Siberian state medical university»
 Ministry of Healthcare and Social development of the Russian Federation, Tomsk

² State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education
 «National Research Tomsk Polytechnic University»

Liver, lung, kidney, heart and spleen structure of rats after multiple intravenous injections of magnetite nanosuspension

Effects of multiple intravenous magnetite nanosuspension injections on the structure of rat liver, lungs, kidney, heart and spleen have been studied. Histology of the organs listed have found haemodynamic distortions and necrotic lesions in the parenchyma of these organs. With the help of Pearls histochemical method significant piling of nanoparticles were found in the cells of the mononuclear phagocytes in liver, lungs and spleen of the rats. Only singular Pearls-positive cells were found in kidneys and hearts of the rats.

Key words: magnetite nanoparticles, visceral histology.

вляли по Меркулову. Срезы окрашивались по методу Перлса, после чего докрашивались гематоксилином и эозином по Саркисову.

В зависимости от количества гранул в цитоплазме Перлс-позитивных макрофагов выделяли три морфологических класса:

1 — макрофаги, цитоплазма которых переполнена Перлс-позитивными гранулами (более 30 в клетке);

2 — макрофаги, умеренно нагруженные Перлс-позитивными гранулами;

3 — макрофаги, имеющие единичные Перлс-позитивные гранулы в цитоплазме (не более 5 штук в клетке) [6].

Результаты

Структура изученных органов после внутривенного введения стабилизирующего раствора не отличается от таковой у интактных крыс в аналогичные сроки. Реакция Перлса в печени, легком, почках и сердце животных интактной и контрольной групп была отрицательной, а в селезенке крыс этих двух групп — положительной.

На 7-е сутки от начала эксперимента (3 инъекции, суммарная доза 300 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела) в периферических отделах печеночных долек выражены явления моноцеллюлярного некроза гепатоцитов. Артерии портальных трактов спазмированы, вены расширены, местами полнокровны, междольковые желчные протоки расширены (рис. 1). Синусоиды перипортальных и промежуточных отделов долек гиперемизированы. Встречаются единичные полнокровные центральные и поддольковые вены. На всем протяжении синусоидов печеночных долек выявляются клетки Купфера (звездчатые макрофаги), которые дают положительную реакцию Перлса. Так, на периферии печеночной дольки определяется большое количество клеток Купфера, главным образом 1 и 2-го классов.

На 14-е сутки (6 инъекций, суммарная доза 600 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела) в перипортальных и промежуточных отделах дольки встречаются отдельные некротизированные гепатоциты. Просвет синусоидов расширен

на всем протяжении. Артерии в портальных трактах спазмированы, вены расширены, полнокровны. В перипортальных отделах синусоидов и в области портальных трактов имеются скопления Перлс-позитивных клеток всех трех классов с преобладанием первого.

На 21-е сутки (10 инъекций, суммарная доза 1 г (Fe_3O_4) / кг массы тела) структура печени сохранена. Отмечается полнокровие части центральных вен, значительное расширение синусоидных капилляров во всех отделах печеночных долек. В перипортальных отделах печеночных долек по-прежнему встречаются единичные некротизированные гепатоциты, здесь же скапливаются Перлс-позитивные макрофаги, представленные главным образом клетками Купфера 1-го класса.

На 40-е сутки (20 инъекций, суммарная доза 2 г (Fe_3O_4) / кг массы тела) структура печени по сравнению с предыдущим сроком существенно не изменена.

В легких животных, выведенных из эксперимента через 7 суток (3 инъекции, суммарная доза 300 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела), наблюдается расширение межальвеолярных перегородок и полнокровие микроциркуляторного русла. Артериальные сосуды спазмированы, вены расширены, выражен периваскулярный отек. Альвеолярные макрофаги выявляются периваскулярно и перибронхиально, они представлены немногочисленными клетками, содержащими умеренное количество гранул магнетита (рис. 2).

На 14-е сутки (6 инъекций, суммарная доза 600 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела) межальвеолярные перегородки по-прежнему отечны и расширены. Повсеместно отмечаются полнокровие венозных сосудов, спазм артерий и периваскулярный отек. В просвете бронхов, в межальвеолярных перегородках и перибронхиально расположены скопления альвеолярных Перлс-позитивных макрофагов 1 и 2-го классов, число которых представляется увеличенным по сравнению с предыдущим сроком.

На 21-е сутки (10 инъекций, суммарная доза 1 г (Fe_3O_4) / кг массы тела) выраженность описанных выше гемодинамических расстройств снижается. Уменьшаются проявления периваскулярного отека и отека межальвеолярных перегородок, лишь местами встречается полнокровные венозные сосуды. Перлс-позитивные макро-

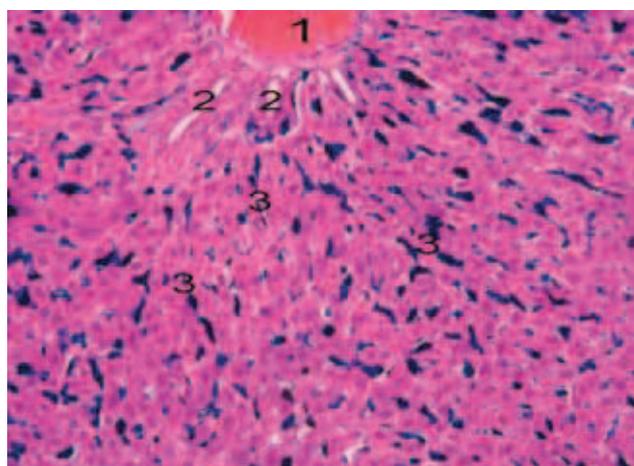


Рис. 1. Печень крысы через 7 суток от начала эксперимента. Дискомплексація печеночних пластинок, полнокровие междольковых вен (1) и расширение междольковых желчных протоков (2). Перлс-позитивные клетки располагаются перисинусоидально (3). Об. 20, ок. 10. Окр.: реакция Перлса с докраской гематоксилином и эозином

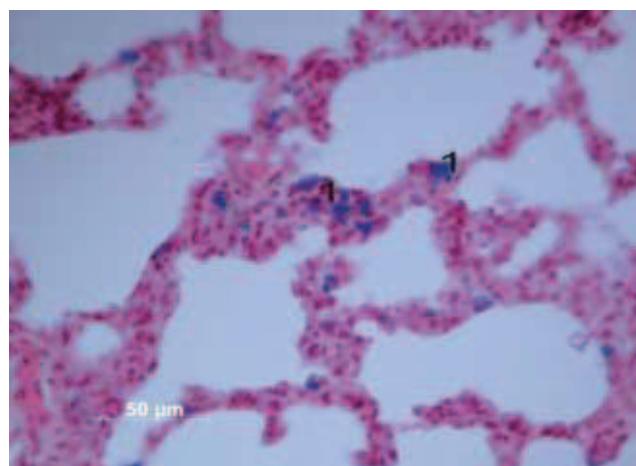


Рис. 2. Легкое крысы через 7 суток от начала эксперимента. Перлс-позитивные клетки располагается в межальвеолярных перегородках (1). Об. 20, ок. 10. Окр.: реакция Перлса с докраской гематоксилином и эозином

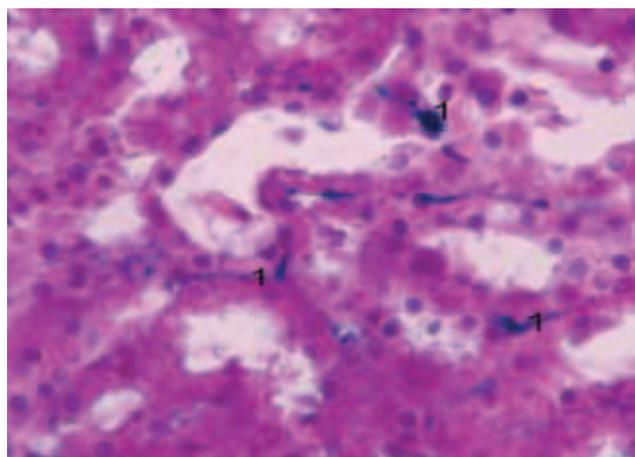


Рис. 3. Почки крыс на 40-е сутки от начала эксперимента. Единичные Перлс-позитивные клетки в межканальцевой соединительной ткани (1). Об. 40, ок. 10. Окр.: реакция Перлса с докраской гематоксилином и эозином

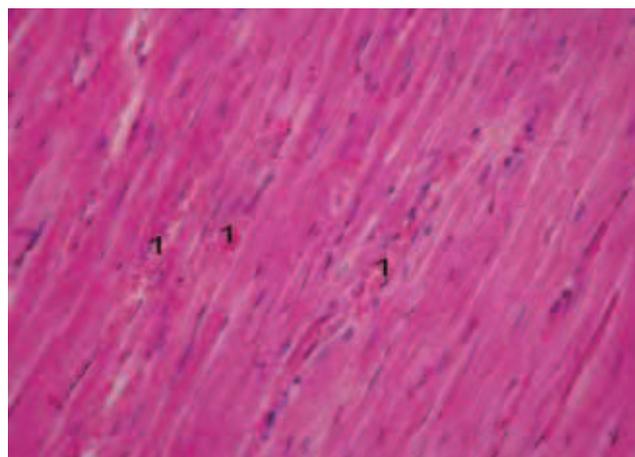


Рис. 4. Миокард крыс через 7 суток от начала эксперимента. Полнокровные капилляры (1). Об. 20, ок. 10. Окр.: реакция Перлса с докраской гематоксилином и эозином

фаги, представленные клетками 1 и 2-го классов, обнаруживаются в просвете альвеол и бронхов, а также перибронхиально и в межальвеолярных перегородках.

На 40-е сутки (20 инъекций, суммарная доза 2 г (Fe_3O_4) / кг массы тела) структура легкого без особенностей, гемодинамические нарушения не выражены. В строме легкого и в просвете альвеол располагается большое количество Перлс-позитивных клеток, которые представлены главным образом клетками 1 и 2-го классов.

В почках крыс, выведенных из эксперимента через 7 суток от начала введения наноразмерного магнетита (3 инъекции, суммарная доза 300 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела), наблюдаются полнокровные капилляры клубочков, значительное расширение просвета капсул Шумлянско–Боумана, отек интерстиция. Наряду с этим выявлялся моноцеллюлярный некроз эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев. В строме органа встречаются единичные Перлс-позитивные клетки, главным образом с умеренным количеством гранул в цитоплазме.

На 14-е сутки (6 инъекций, суммарная доза 600 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела) в корковом веществе почки наблюдаются очаговый некроз эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев, умеренное расширение просвета капсулы Шумлянско–Боумана, расширение капилляров почечного тельца, часть которых полнокровны, а часть запустевает. Вены коркового вещества полнокровны. В просвете дистальных извитых канальцев и нисходящих отделов петли Генле имеются цилиндры. В интерстиции встречаются единичные Перлс-позитивные клетки 2-го класса, количество которых представляется таким же, что и в предыдущий срок.

На 21-е сутки (10 инъекций, суммарная доза 1 г (Fe_3O_4) / кг массы тела) структура почек обычная. Отмечается умеренное расширение просвета капсулы Шумлянско–Боумана и капилляров клубочка. Просвет проксимальных и дистальных извитых канальцев расширен, эпителий уплощен. В межканальцевой соединительной ткани изредка встречаются Перлс-позитивные клетки с единичными гранулами.

На 40-е сутки (20 инъекций, суммарная доза 2 г (Fe_3O_4) / кг массы тела) в почках наблюдается уменьшение выраженности описанных выше дисциркуляторных расстройств. В интерстициальной соединительной ткани —

единичные Перлс-позитивные макрофаги 3-го класса (рис. 3).

В сердце крыс к 7-м суткам от начала введения магнетита (3 инъекции, суммарная доза 300 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела) отмечается полнокровные капилляры и вен. Кардиомиоциты имеют обычный вид. Реакция Перлса отрицательна (рис. 4).

В строме миокарда на 14-е сутки (6 инъекций, суммарная доза 600 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела) капилляры полнокровны, определяется периваскулярный отек. Изредка между кардиомиоцитами встречаются Перлс-позитивные клетки 2-го класса (1 клетка на 4–5 полей зрения).

На 21-е (10 инъекций, суммарная доза 1 г (Fe_3O_4) / кг массы тела) и 40-е сутки (20 инъекций, суммарная доза 2 г (Fe_3O_4) / кг массы тела) в миокарде крыс выявляются полнокровные капилляры и вен. Определяются единичные погибшие кардиомиоциты, которые характеризуются отсутствием ядра и поперечной исчерченности. Перлс-позитивные клетки 2-го класса в перикарде и миокарде единичны, 1–2 клетки на 3 поля зрения.

В паренхиме селезенки крыс на 7-е сутки (3 инъекции, суммарная доза 300 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела) центральные артерии спазмированы. Определяется большое количество Перлс-позитивных макрофагов 1 и 2-го классов, которые скапливаются пери- и внутрифолликулярно.

К 14-м суткам (6 инъекций, суммарная доза 600 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела) фолликулы и красная пульпа содержат Перлс-положительные клетки 1-го класса.

К 21-м суткам (10 инъекций, суммарная доза 1 г (Fe_3O_4) / кг массы тела) количество Перлс-позитивных клеток 1-го класса в сравнении с предыдущим сроком представляется увеличенным. Клетки лежат пери- и интрафолликулярно, причем внутри фолликулов располагаются главным образом клетки 2-го класса, тогда как перифолликулярно — клетки всех трех классов.

На 40-е сутки (20 инъекций, суммарная доза 2 г (Fe_3O_4) / кг массы тела) в паренхиме селезенки определяется большое количество Перлс-позитивных макрофагов, которые располагаются повсеместно. Преобладающим классом Перлс-позитивных клеток, лежащих как интра-, так и перифолликулярно, являются клетки 1-го класса, цитоплазма которых переполнена магнетитом.

Обсуждение

Изменения внутренних органов крыс в предпринятом нами эксперименте могут являться результатом как прямого действия наноразмерных частиц на клетки этих органов, так и быть опосредованными (например, нарушение микроциркуляции за счет эмболии сосудов микроциркуляторного русла агломератами наноразмерных частиц; внутрисосудистая или внутриклеточная активация свободно радикальных процессов; инициация освобождения цитокинов клетками, участвующими в элиминации наноразмерных частиц и т.д.), которые вызывают ишемическое, токсическое или рецепторопосредованное повреждение клеток [2, 7–9].

Усиление дисциркуляторных и стабилизация некротических изменений в печени крыс к 14-м суткам (600 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела) демонстрирует, что адаптация паренхиматозных клеток к воздействию наноразмерных частиц магнетита происходит быстрее, нежели стабилизация гемодинамических изменений в строме. Компенсаторно-приспособительные реакции, проявляющиеся снижением выраженности дисциркуляторных изменений, развиваются в строме лишь к 21-м суткам.

Скопление Перлс-позитивных клеток Купфера в печени к 7-м суткам перипортально — проявление их миграции от синусоидов к желчевыводящим путям портальных трактов с последующим проникновением в их просвет. Эти наблюдения подтверждают наличие механизма выведения наноразмерных частиц из органа в составе желчи [10].

Отсутствие деструктивных явлений в легком животных к 7-м суткам (суммарная доза 300 мг (Fe_3O_4) / кг массы тела), возможно, объясняется меньшим проникновением наноразмерных частиц магнетита в легкое по сравнению с печенью. К концу эксперимента выраженность и распространенность описанных выше гемодинамических расстройств снижается, что свидетельствует о развитии адаптационно-приспособительных процессов.

В легком крыс на ранних сроках эксперимента Перлс-позитивные макрофаги лежат периваскулярно, что иллюстрирует начальную стадию взаимодействия этих клеток с наноматериалом непосредственно после его проникновения в ткань из просвета сосуда [8, 11]. В дальнейшем скопления Перлс-позитивных клеток обнаруживаются преимущественно в межальвеолярных перегородках и перибронхиально. Кроме того, отдельные клетки находятся в просвете альвеол и бронхов, что отражает заключительный этап взаимодействия альвеолярных макрофагов с частицами магнетита, а именно их миграцию в просвет бронхиального дерева. Общее количество Перлс-позитивных макрофагов в легком к 40-м суткам представляется сниженным, что иллюстрирует активное участие системы нейротрофического фактора мозга в процессах выведения наноразмерных частиц магнетита.

Развитие дисциркуляторных и некротических изменений в почках крыс в ранние сроки эксперимента иллю-

стрирует их активное участие в элиминации наноразмерных частиц [9]. Нарастание выраженности дисциркуляторных изменений к 14-м суткам, видимо, обуславливает прогрессирование некротических изменений. К 40-м суткам дисциркуляторные изменения в почках выражены слабо, что свидетельствует о реализации адаптационно-приспособительных механизмов. Относительно небольшое количество Перлс-положительных клеток в почках животных во все исследованные сроки свидетельствует о том, что почки не накапливают наноразмерные частицы магнетита.

Миокард крыс в ранние сроки не имеет морфологических изменений, что демонстрирует отсутствие повреждающего действия наноразмерного магнетита на сердце. Негативное влияние на сердце наноразмерных частиц, выражающееся гибелью кардиомиоцитов по механизму некроза, проявляется с 21-х суток. Возможно, гибель кардиомиоцитов развивается вследствие ишемии, возникающей в результате дисциркуляторных расстройств в миокарде. К 40-м суткам ишемические изменения, вероятно, прогрессируют, что подтверждается усугублением (распространенности и выраженности) дисциркуляторных расстройств.

Следует отметить, что небольшое количество Перлс-позитивных клеток в почках и сердце крыс объясняется относительно слабым развитием системы МНФ в этих органах.

Несмотря на активное участие селезенки в процессах секвестрации свободных наноразмерных частиц магнетита из крови и накопление их в клетках системы МНФ, существенных морфологических изменений в ней не выявляется, что свидетельствует о широких компенсаторных возможностях этого органа. Селезенка, по-видимому, оказывает системный протективный эффект, защищая другие органы от воздействия наноматериала, снижая его концентрацию в крови [12].

Разделение Перлс-позитивных клеток на три класса играет существенную роль в понимании процессов элиминации наноразмерных частиц клетками системы МНФ и отражает последовательность стадий накопления ими наноматериала.

Отсутствие Перлс-положительного окрашивания клеток паренхимы исследованных органов можно объяснить низким содержанием и высокой дисперсностью наноматериала, а также, возможно, недостаточной чувствительностью гистохимического метода Перлса.

Итак, многократное внутривенное введение суспензии наноразмерного магнетита характеризуется развитием дисциркуляторных и некротических изменений в печени, почках и сердце, а также развитием дисциркуляторных изменений в легком и селезенке, выраженность которых снижается к 40-м суткам. Внутривенное введение магнетита сопровождается значительным накоплением его частиц в клетках системы МНФ печени, легкого и селезенки крыс. В почках и сердце крыс встречаются единичные Перлс-позитивные клетки даже в поздние экспериментальные сроки. С ростом суммарной дозы магнетита количество Перлс-позитивных клеток в изученных органах к концу эксперимента представляется нарастающим.

REFERENCES

- Lu A.H., Salabas E.L., Schuth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int.* 2007; 46 (8): 1222–1244.
- Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Bioscience Bioengineering.* 2005; 100 (1): 1–11.
- Gupta A.G., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* 2005; 26 (18): 3995–4021.
- Moore A., Marecos E., Bogdanov A. Jr. et al. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology.* 2000; 214 (2): 568–574.
- Zhang Y., Kohler N., Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials.* 2002; 23 (7): 1553–1561.
- Mil'to I.V. Vliianie nanorazmernykh chastitc oksida zheleza na morfofunktsional'noe sostoianie vnutrennikh organov kry's. *Avtooref. dis. ... qand. biol. nauq. Tomsk.* 2010. 165.

7. Rosi N.L., Mirkin C.A. Nanostructures in biodiagnostics. *Chemistry review*. 2005; 105 (4): 1547–1562.
8. Peters A., Wichmann H.E., Tuch T. et al. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1997; 155 (4): 1376–1383.
9. Manil L., Davin J.C., Duchenne C. et al. Uptake of nanoparticles by rat glomerular mesangial cells in vivo and in vitro. *Pharm. Res.* 1994; 11: 1160–1165.
10. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K. et al. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009; 72 (3): 496–501.
11. Brown J.S., Zeman K.L., Bennett W.D. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2002; 166 (9): 1240–1247.
12. Demoy M., Andreux J.-P., Weingarten C. et al. Spleen capture of nanoparticles: influence of animal species and surface characteristics. *Pharmaceutical Research*. 1999; 16 (1): 37–41.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Мильто Иван Васильевич, кандидат биологических наук, ассистент кафедры биотехнологии и органической химии ФГБОУ ВПО НИ ТПУ, руководитель научно-образовательного центра «Инновационные технологии в морфологии» Сибирского государственного медицинского университета Минздравсоцразвития России

Адрес: 636036, Северск, ул. Крупской, д. 10, кв. 15

Тел.: 8 (3822) 42-64-43

E-mail: milto_bio@mail.ru

Суходоло Ирина Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета Минздравсоцразвития России

Адрес: 634003, Томск, пер. Кустарный, д. 1, кв. 11

Тел.: 8 (3822) 42-64-43

E-mail: suhodolo@sibmail.com