

© И. В. Мильто, И. В. Суходоло, 2012
УДК 611.24+611.36+611.41+611.61]:615.015.11:599.323.4

И. В. Мильто и И. В. Суходоло

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ОРГАНОВ КРЫС ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНОГО МАГНЕТИТА

Кафедра морфологии и общей патологии (зав. — проф. И. В. Суходоло), Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, e-mail: milto_bio@mail.ru

Цель работы состояла в выявлении морфологических изменений печени, легкого, почек и селезенки, включая клетки системы мононуклеарных фагоцитов в этих органах, у 60 крыс через 1–40 сут после однократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита. Описаны умеренные гемодинамические расстройства и фокальные некротические изменения паренхимы печени и почек. В легких и селезенке показаны только гемодинамические нарушения. Выраженность морфологических изменений в печени, легких, почках и селезенке у крыс снижается к 40-м суткам. Гистохимическим методом Перлса выявлено накопление частиц наноматериала в клетках системы мононуклеарных фагоцитов исследованных органов.

Ключевые слова: *печень, легкие, почки, селезенка, наноразмерный магнетит*

Интерес к использованию наноматериалов в медицине обусловлен тем, что в настоящее время достигнут известный предел повышения эффективности традиционных методов лечения. В качестве возможной области применения магнитных наноразмерных частиц магнетита рассматриваются: магнитно-резонансная диагностика, целевая доставка лекарств, управляемая локальная гипертермия и др. [1, 6, 8].

Известно, что органы-мишени большинства наночастиц имеют хорошо развитую систему мононуклеарных фагоцитов (МНФ) [10]. Для биомедицинских целей чаще всего используется магнетит (Fe_3O_4), который представляет собой смесь различных оксидов железа [17].

Цель данной работы — выявление морфологических изменений в печени, легком, почках, селезенке и системе их МНФ у крыс после однократного внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита.

Материал и методы. Исследование проведено на 60 беспородных крысах-самцах массой 150 ± 30 г, которые были разделены на 3 группы по 20 животных в каждой. 1-я группа — интактные животные; 2-я (контрольная) группа — животным однократно в хвостовую вену вводили 2 мл стабилизирующего раствора, который представлял собой раствор (рН 7,4), содержащий хлорид натрия (108 ммоль), цитрат натрия (20 ммоль) (РЕАХИМ, Россия) и натриевую соль 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфониевой кислоты — НЕРЕС (10 ммоль) (AppliChem GmbH, Германия); 3-я (подопытная) группа — животным однократно аналогичным образом в том же объеме вводили стандартизованную суспензию магнетита [0,1 г (Fe_3O_4)/кг], при этом сухой магнетит растворяли в стабилизирующем растворе,

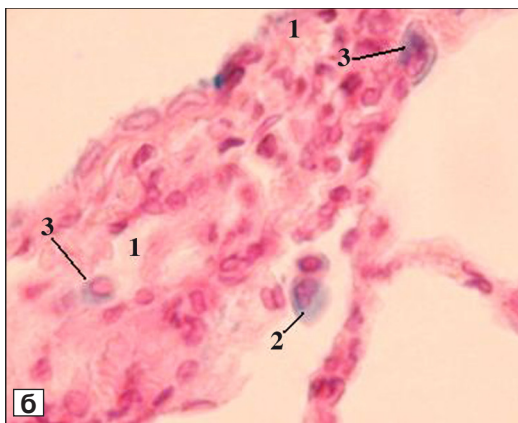
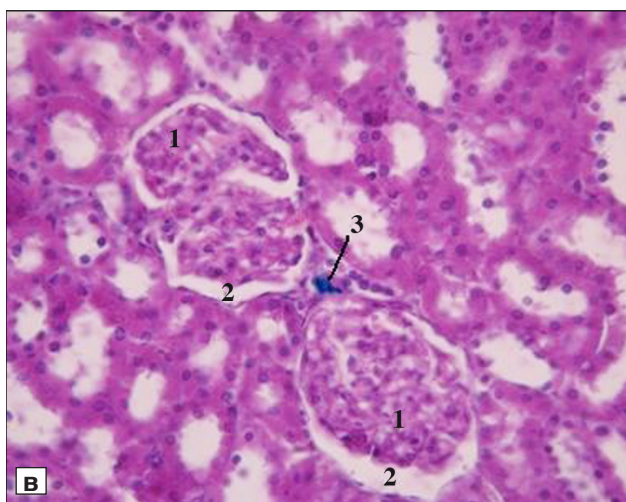
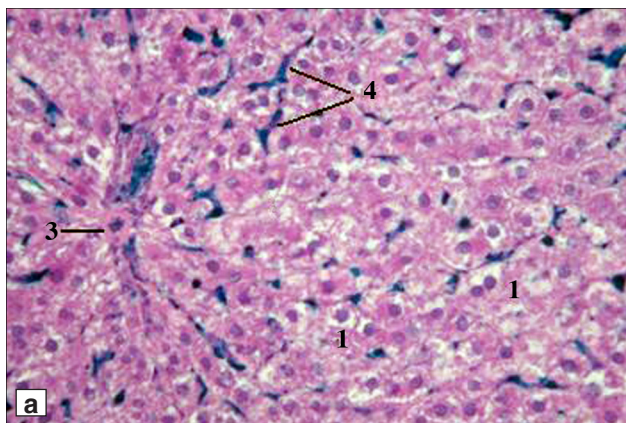
обрабатывали ультразвуком и центрифугировали, после чего использовали для инъекций.

Животных декапитировали под эфирным наркозом через 1, 7, 14 и 40 сут после инъекции, взятие материала у животных всех групп производили в одно и то же время. Для исследования брали печень, лёгкое, почки и селезенку.

Материал фиксировали в 10% формалине (рН 7,4), обезвоживали в изопропанол (BioVitrum, Россия) и заливали в парафиновую смесь HistoMix. Для идентификации в тканях наноразмерных частиц магнетита использовали гистохимическую реакцию с ферроцианидом калия — метод Перлса, после чего срезы докрашивали гематоксилином — эозином. В зависимости от количества гранул в цитоплазме Перлс-позитивных макрофагов выделяли 3 морфологических класса: 1-й класс — макрофаги, цитоплазма которых переполнена Перлс-позитивными гранулами. Гранулы расположены плотно, накладываются друг на друга, маскируют ядро (более 30 в клетке); 2-й класс — макрофаги, умеренно нагруженные Перлс-позитивными гранулами; 3-й класс — макрофаги, имеющие единичные Перлс-позитивные гранулы в цитоплазме (не более 5 в клетке).

Результаты исследования. Изучаемые органы животных после внутривенного введения стабилизирующего раствора (2-я группа) имеют обычное строение, которое не отличается от такового у интактных крыс в аналогичные сроки. Реакция Перлса в печени, легком и почках у животных интактной и контрольной групп была отрицательной, а в селезенке — положительной.

Через 1 сут после однократного внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита в печени крыс наблюдается изменение тинкториальных свойств гепатоцитов: в периферических и центральных зонах печеночных долек цитоплазма гепатоцитов окрашивается эозином более интенсивно, чем в промежуточной зоне. В перифери-



Изменения в различных органах у крысы через 7 сут после внутривенного введения суспензии магнетита.

а — дискомплексация печеночных пластинок, дистрофические изменения (1) и моноцеллюлярный некроз гепатоцитов (2); гиалиноз междольковых артерий (3); Перлс-положительные клетки располагаются перисинусоидально (4); б — умеренный общий отек легкого и расширение междольковых перегородок (1); Перлс-положительные макрофаги в просвете альвеол (2) и в междольковых перегородках (3); в — почка. Полнокровие клубочковых капиллярных сосудов (1), расширение полости капсулы клубочка (2); Перлс-положительные клетки в соединительнотканной строме (3). Реакция Перлса с докраской гематоксилином — эозином. Ув.: а, в — 200; б — 400.

ческих и промежуточных зонах долек наблюдаются единичные некротизированные гепатоциты. Периферические отделы синусоидов спавшиеся. Промежуточные отделы синусоидов расширены, в них наблюдается сладж-эффект эритроцитов. Встречаются полнокровные центральные вены. На всем протяжении синусоидов печеночных долек выявляются звездчатые макрофаги (клетки Купфера), которые дают Перлс-положительную реакцию.

Преобладают клетки 3-го класса, которые расположены, главным образом, в периферических и промежуточных зонах печеночных долек.

На 7-е сутки гепатоциты периферических и промежуточных зон печеночных долек находятся в состоянии баллонной дистрофии. Во всех зонах печеночных долек имеются некротизированные гепатоциты. Артерии в печеночных триадах спазмированы, вены расширены, местами полнокровны. Синусоиды в центральных и промежуточных зонах долек расширены. Встречаются единичные полнокровные центральные и поддольковые вены. Имеется большое количество Перлс-положительных звездчатых макрофагов, относящихся, главным образом, к клеткам 2-го класса. В периферических зонах долек преобладают Перлс-положительные клетки 1-го класса. Общее количество Перлс-

положительных клеток визуально несколько меньше, чем на 1-е сутки (рисунок, а).

На 14-е сутки в печени дисциркуляторные расстройства прогрессируют: значительно выражено полнокровие центральных и поддольковых вен. Синусоиды умеренно расширены в периферических и промежуточных зонах печеночных долек. В синусоидах и перипортальном пространстве имеются Перлс-положительные клетки всех трех классов, с преобладанием умеренно нагруженных гранулами.

На 40-е сутки эксперимента наблюдается умеренное полнокровие части центральных и поддольковых вен, синусоиды в промежуточных зонах печеночных долек расширены. В синусоидах и перипортальном пространстве выявляется примерно одинаковое количество Перлс-положительных клеток 2-го и 3-го классов.

В легких у животных через 1 сут после внутривенного введения наноразмерных частиц магнетита наблюдается расширение междольковых перегородок и полнокровие сосудов микроциркуляторного русла. Артериальные сосуды спазмированы, вены расширены, отмечается периваскулярный отек. Интерстициальные макрофаги с умеренным количеством Перлс-положительных гранул выявляются периваскулярно и перибронхиально.

На 7-е сутки межалвеолярные перегородки сохраняются отечными и расширенными. Повсеместно отмечаются полнокровие вен, спазм артерий и периваскулярный отек. В межалвеолярных перегородках и перибронхиально расположены скопления интерстициальных Перлс-позитивных макрофагов, которые принадлежат к клеткам 2-го и 3-го классов (см. рисунок, б).

На 14-е сутки выраженность описанных выше гемодинамических расстройств в легких снижается. Уменьшаются проявления периваскулярного отека и отека межалвеолярных перегородок. Полнокровие микроциркуляторного русла не выражено, местами встречаются полнокровные вены. Перлс-позитивные макрофаги обнаруживаются в просвете альвеол и внутридольковых бронхов (альвеолярные), а также перибронхиально и в межалвеолярных перегородках (интерстициальные). В целом, Перлс-позитивных клеток меньше, чем на 7-е сутки, и они представлены, преимущественно, клетками 2-го класса.

Строение легкого у крыс на 40-е сутки после однократного введения наноразмерных частиц магнетита соответствует таковому у животных интактной и контрольной групп в аналогичный срок. При этом, в строении органа сохраняется небольшое количество Перлс-позитивных интерстициальных макрофагов, преобладают клетки с умеренным количеством гранул в цитоплазме.

В почках животных через 1 сут от начала опыта наблюдалось полнокровие клубочковой капиллярной сети, значительное расширение полости капсулы клубочка, отёк стромы. Просвет проксимальных и дистальных извитых канальцев расширен, эпителий уплощен, в дистальных извитых канальцах встречаются цилиндры. В строме органа выявляются единичные Перлс-позитивные клетки 3-го класса.

На 7-е сутки полости капсулы клубочка и клубочковая капиллярная сеть значительно расширены. В собирательных трубках определяются цилиндры. В строме встречается небольшое количество Перлс-позитивных макрофагов с единичными гранулами (рисунок, в).

На 14-е сутки в корковом веществе почки наблюдаются некроз эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев и многочисленные кровоизлияния. Вены коркового вещества полнокровны. В просвете дистальных извитых канальцев и нисходящих тонких сегментов петли нефрона имеются цилиндры. В строме почки встречаются единичные Перлс-позитивные клетки 3-го класса, количество которых визуальное такое же, как на 1-е и 7-е сутки.

На 40-е сутки полости капсулы клубочка умеренно расширены. Эпителий дистальных извитых канальцев уплощен. Реакция Перлса — отрицательна.

Паренхима селезёнки животных интактной и контрольной группы имеет обычный вид, однако, в красной пульпе, особенно вокруг лимфоидных узелков, выявляются Перлс-позитивные макрофаги 2-го и 3-го классов, с преобладанием 2-го.

На 1-е и 7-е сутки после введения магнетита в селезенке центральные артериолы в лимфоидных узелках спазмированы. В паренхиме органа определяется большое количество Перлс-позитивных макрофагов, принадлежащих к 1-му и 2-му классам.

К 14-м суткам незначительные дисциркуляторные нарушения, возникающие в ранние сроки, нормализуются. Перлс-позитивные клетки всех трех классов расположены перинодулярно, внутри лимфоидных узелков находятся, главным образом, клетки 2-го и 3-го классов.

На 40-е сутки Перлс-позитивные макрофаги, главным образом 2-го класса, располагаются повсеместно в красной и белой пульпе.

Обсуждение полученных данных. Разделение Перлс-позитивных клеток на 3 класса важно для понимания процессов элиминации наноразмерных частиц клетками системы МНФ и отражает последовательность накопления ими наноматериала.

Преобладание на 1-е сутки в изученных органах Перлс-позитивных клеток с единичными гранулами в цитоплазме (3-й класс) объясняется вовлечением системы МНФ в процесс поглощения наноразмерных частиц, тогда как увеличение количества клеток 1-го и 2-го классов в более поздние сроки отражает процесс накопления клетками 3-го класса частиц магнетита вследствие поглощения наноматериала из сосудистого русла.

Увеличение степени выраженности морфологических изменений в печени к 14-м суткам можно объяснить прогрессирующими гемодинамическими нарушениями, которые способствуют гипоксическому и токсическому повреждению ее клеток [12]. Кроме того, возможен перекисный механизм повреждения клеток: показано участие наночастиц магнетита в образовании гидроксильных радикалов [16].

Нормализация структуры печени и снижение количества Перлс-позитивных клеток к 40-м суткам позволяют сделать вывод об элиминации наноразмерных частиц, а также о широких компенсаторных возможностях органа [13].

Скопление звездчатых макрофагов, перегруженных наноразмерным магнетитом, в перипор-

тальном пространстве объясняется их миграцией из синусоидов к междольковым желчным протокам, что необходимо для их выведения с желчью [7].

Вероятно, покидать организм Перлс-позитивные клетки могут на любой стадии накопления наноматериала, но, прежде всего, выведение магнетита осуществляют клетки 1-го и 2-го класса, которые захватили наибольшее количество наночастиц.

К концу эксперимента в перипортальном пространстве скапливаются звездчатые макрофаги всех трёх классов, что иллюстрирует заключительные этапы выведения магнетита из организма крыс.

Возможно выведение магнетита посредством и других механизмов, например, метаболизирование в лизосомах, по аналогии с описанными в литературе преобразованиями наночастиц другого качественного состава. Так, изменение поверхностного заряда полилактидных наночастиц, происходящее в условиях кислой среды внутри лизосом, способствует выходу частиц из лизосом и накоплению их в цитоплазме [14]. Известно также, что кварцевые наночастицы повышают проницаемость мембран лизосом альвеолярных макрофагов [18].

Наиболее вероятным механизмом метаболизирования железосодержащих наноразмерных частиц является их растворение в кислой среде лизосом после интернализации путем эндоцитоза [11].

Нивелирование дисциркуляторных изменений и уменьшение количества Перлс-позитивных клеток у крыс в легком к 40-м суткам после однократного внутривенного введения суспензии магнетита объясняется выведением наноразмерных частиц и развитием комплекса компенсаторно-приспособительных реакций уже на 14-е сутки. Изменения в легком могут быть вызваны как непосредственным повреждающим воздействием наноразмерных частиц на альвеолоциты и эндотелий, так и опосредованным, через факторы, выделяемые активированными макрофагами и клетками соединительной ткани [2, 5]. В ранние сроки в легком у крыс Перлс-позитивные клетки располагаются в межалвеолярных перегородках и перикапиллярно, что отражает начальные этапы поглощения ими наноразмерных частиц магнетита из сосудов микроциркуляторного русла. К 7-м суткам в легких у животных после введения суспензии магнетита Перлс-позитивные макрофаги начинают кумулироваться перибронхиально и перибронхиолярно, что, по-видимому, свидетельствует о начале активного выхода кле-

ток в просвет бронхиального дерева [3, 15]. В просвете бронхов находятся только клетки 1-го класса, которые поглощают максимальное количество частиц магнетита. Клетки 3-го класса, по-видимому, обеспечивают выведение наночастиц магнетита другими механизмами. Например, путем преобразования кристаллической формы магнетита в ионную в лизосомах [11] либо дальнейшего поглощения и накопления магнетита в цитоплазме с преобразованием в клетки 2-го или 1-го классов, которые способны покинуть легкое путем миграции в просвет альвеол.

Характерное расположение Перлс-позитивных макрофагов в легком перибронхиально, перибронхиолярно, а также в межалвеолярных перегородках позволяет предположить механизм удаления наноматериала из организма крысы путем миграции этих клеток в просвет бронхиального дерева и выведения из организма в составе бронхиальной слизи.

Слабоположительная реакция Перлса в почках, по-видимому, объясняется относительно слабым развитием системы МНФ в этом органе, а также преимущественным выведением наноматериала иными путями, например, путем фильтрации или секреции, которые преимущественно обеспечивают выделительную функцию почек. Выраженность морфологических изменений при фактическом низком содержании магнетита в почках свидетельствует об опосредованном повреждении наноразмерными частицами её структурно-функциональных элементов [9].

Селезенка, по-видимому, дает системный протективный эффект, защищая другие органы от воздействия наноматериала, снижая его концентрацию в крови путем элиминации наночастиц клетками системы МНФ [4]. Отсутствие признаков повреждений паренхимы при относительно высоком содержании Перлс-позитивного материала свидетельствует о широких компенсаторных возможностях этого органа.

Положительную реакцию Перлса в селезенке крыс интактной и контрольной групп можно объяснить активным участием последней в метаболизме железа в организме.

Сохранение положительной реакции Перлса на препаратах печени, селезенки и легкого в течение 40 сут после однократного внутривенного введения магнетита свидетельствует о низкой скорости выведения наноматериала из организма крыс и о склонности его к накоплению. Сроки проведенного эксперимента не позволили установить время, в течение которого происходит полное выведение магнетита из организма животного.

Отсутствие Перлс-позитивной реакции в исследованных органах можно объяснить низким содержанием и высокой дисперсностью наноматериала, а также, возможно, недостаточной чувствительностью гистохимического метода Перлса.

Итак, однократное внутривенное введение суспензии наноразмерного магнетита сопровождается развитием дисциркуляторных и некротических изменений в печени и почках, а также развитием дисциркуляторных изменений в легком и селезенке, выраженность которых снижается или полностью нивелируется к 40-м суткам. Однократное внутривенное введение суспензии наноразмерного магнетита сопровождается накоплением его частиц в клетках системы МНФ печени, легкого, селезенки и почек крыс. Этот факт подтверждается выявлением Перлс-позитивных клеток на светооптическом уровне. Общее количество Перлс-позитивных клеток в исследованных органах снижается к 40-м суткам.

ЛИТЕРАТУРА

- Alexiou C., Jurgons R., Schmid R. J. et al. Magnetic drug targeting — biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *J. Drug Target.*, 2003, v. 11, p. 139–149.
- Brown D. M., Donaldson K., Borm P. J. et al. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 2004, v. 286, p. 344–353.
- Brown J. S., Zeman K. L. and Bennett W. D. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2002, v. 166, p. 1240–1247.
- Demoy M., Andreux J. P., Weingarten C. et al. Spleen capture of nanoparticles: influence of animal species and surface characteristics. *Pharm. Res.*, 1999, v. 16, p. 37–41.
- Hamilton R. F., Thakur S. A. and Holian A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, v. 44, p. 1246–1258.
- Ito A., Tanaka K., Honda H. et al. Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequent repeated hyperthermia using magnetite nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.*, 2003, v. 96, № 4, p. 364–369.
- Jani P. U., McCarthy D. E. and Florence A. T. Titanium dioxide (rutile) particles uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *Int. J. Pharm.*, 1994, v. 105, p. 157–168.
- Lubbe A. S., Alexiou C. and Bergemann C. Clinical applications of magnetic drug targeting. *J. Surg. Res.*, 2001, v. 95, p. 200–206.
- 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, v. 5, p. 134–144.
- Neerman M. F., Zhang W., Parrish A. R. and Simanek E. E. In vitro and in vivo evaluation of a melamine dendrimer as a vehicle for drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 2004, v. 281, p. 129–132.
- Nel A., Xia T., Madler L. and Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 2006, v. 311, p. 622–627.
- Nishimori H., Kondoh M., Isodaa K. et al. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, 2009, v. 72, p. 496–501.
- Okon E., Pouliquen D., Okon P. and Kovaleva Z. V. Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat: a histological and biophysical study. *Lab invest.*, 1994, v. 71, № 6, p. 895–903.
- Panyam J., Zhou W. Z., Prabha S. et al. Rapid endo-lysosomal escape of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J.*, 2002, v. 16, p. 1217–1226.
- 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, v. 155, p. 1376–1383.
- Rosi N. L. and Mirkin C. A. Nanostructures in biodiagnostics. *Chemistry Rev.*, 2005, v. 105, № 4, p. 1547–1562.
- Tartaj P., Morales M. P., Veintemillas-Verdaguer S. et al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 2003, v. 36, № 13, p. 182–197.
- Thibodeau M. S., Giardina C., Knecht D. A. et al. Silica induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. *Toxicol. Sci.*, 2004, v. 80, p. 34–48.

Поступила в редакцию 15.03.2011

Получена после доработки 17.01.2012

STRUCTURAL CHANGES OF SOME ORGANS IN RATS AFTER A SINGLE INTRAVENOUS INJECTION OF MAGNETITE NANOPARTICLES

I. V. Mil'to and I. V. Sukhodolo

The aim of this investigation was to study the morphological changes of liver, lung, kidneys and spleen as well as of the cells of mononuclear phagocyte system in 60 rats 1–40 days after a single intravenous injection of a suspension of magnetite nanoparticles. Moderate hemodynamic disturbances and focal necrotic changes were detected in the hepatic and renal parenchyma. In the lungs and spleen, only hemodynamic disturbances were found. The degree of morphological changes in rat liver, lungs, kidneys and spleen was decreased by day 10. Using Perls histochemical method, the accumulation of nanoparticles was detected in the cells of mononuclear phagocyte system of the organs studied.

Key words: *liver, lungs, kidneys, spleen, magnetite nanoparticles*

Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk