

© И.В. Мильто, А.Н. Дзюман, 2009
УДК 616.36+616.24+616.61]:599.323.4

И.В. Мильто^{1, 2} и А.Н. Дзюман¹

СТРУКТУРА ПЕЧЕНИ, ЛЕГКОГО И ПОЧЕК КРЫС ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ МАГНИТОЛИПОСОМ

¹ Кафедра морфологии и общей патологии (зав. — проф. И.В. Суходоло); ² центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. — проф. А.Н. Байков) Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск; e-mail: milto_bio@mail.ru, dzuman@mail.ru

В работе изучено влияние магнитолипосом на основе наночастиц Fe_3O_4 в различные сроки после их однократного внутривенного введения на структуру печени, почек и легкого крыс. Препараты окрашивали гематоксилином — эозином, а для выявления ионов Fe^{+3} использовали реакцию Перлса. Установлено, что в ранние сроки после внутривенного введения магнитолипосом во всех исследованных органах развиваются гемодинамические расстройства, которые к 14-м суткам в печени и почках дополняются фокальными некрозами и дистрофическими изменениями. Показано накопление наночастиц в клетках системы мононуклеарных фагоцитов этих органов. Установлено повреждающее действие магнитолипосом на структуру печени, почек и легкого, которое обусловлено содержащимися в них ультрадисперсными частицами Fe_3O_4 . Последствия такого влияния для организма крысы в сроки, превышающие время наблюдения в нашем эксперименте, на данном этапе трудно прогнозировать.

Ключевые слова: наночастицы Fe_3O_4 , магнитолипосомы, печень, почка, легкое.

Среди разрабатываемых способов адресной доставки лекарственных препаратов перспективным является использование магнитных наночастиц, как основы для создания магнитоуправляемого носителя лекарственных препаратов [4, 5, 9].

Магнитолипосомы объединяют достижения прошлых лет в области липосомальных технологий с инновационными разработками в сфере нанотехнологий. В сравнении с прочими конструкциями они обладают рядом преимуществ, которые позволяют считать их наиболее перспективными для создания систем адресной доставки лекарственных препаратов; к ним относятся: сходство их оболочки с мембранами клеток по химическому составу, известные механизмы взаимодействия с клеткой, универсальность (липосомы позволяют переносить любые по физико-химическим свойствам вещества), защищенность веществ, которые находятся в её полости от повреждений, простота получения и т.д. [1, 3, 7].

Цель данного исследования — изучение распределения и влияния магнитолипосом на структуру печени, почек и легкого крыс.

Материал и методы. В работе использовали нанопорошок Fe_3O_4 , полученный механохимическим способом в отделе структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН (г. Томск). Водную суспензию нанопорошка подвергали сонификации для разрушения агрегатов наночастиц, затем центрифугировали с целью осаждения не разрушившихся агрегатов. Супернатант отбирали и использовали для приготовления магнитолипосом. Концентрация нанопорошка в супернатанте составляла 7 мг/мл (рентгенофлюоресцентный анализ, Quant'X). Размер частиц в жидкой фазе не превышал 100 нм, разброс от 25 до 90 нм (Zetasizer nano zs).

Получение магнитолипосом осуществляли методом экструзии (экструдер Lipex Biomembranes Inc, Канада) из

препарата фосфатидилхолина (ФХ) (MP Biomedical LCC, Франция) и стандартизированного раствора нанопорошка Fe_3O_4 . Производили экструзию через поликарбонатные фильтры (Costar) с диаметром пор 400 нм, при температуре 51 °С. Размер полученных частиц эмульсии не превышал 400 нм (Zetasizer nano zs). Содержание липидов в полученной эмульсии — 10 мг (ФХ)/мл. Содержание нанопорошка — 5 мг/мл. Детальное установление структуры комплекса липида и наночастиц Fe_3O_4 осуществляли методом просвечивающей электронной микроскопии (JEM-100 CX II, JEOL, Япония).

Исследование проведено на 36 беспородных белых крысах-самцах массой 152 ± 26 г, которые были разделены на 4 группы: 1-я группа — интактные животные (n=6); 2-я группа (n=10) контроль введения раствора Fe_3O_4 — в хвостовую вену вводили 2 мл стандартизированного раствора нанопорошка Fe_3O_4 [0,1 г (Fe_3O_4)/кг]; 3-я группа (n=10) контроль введения липосом — внутривенно в том же объеме вводили препарат полых липосом [135 мг (ФХ)/кг] и 4-я группа (n=10) — внутривенно вводили препарат магнитолипосом [0,07 г (Fe_3O_4)/кг] в объеме 2 мл. Животных декапитировали под эфирным наркозом через 1 и 14 сут после инъекции, в аналогичные сроки брали материал и у интактных животных.

Все опыты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР).

Для гистологического исследования были взяты печень, почки и лёгкие. Кусочки органов фиксировали в 10% формалине 24 ч и заливали в парафин, из блоков готовили срезы толщиной 5 мкм, на которых для выявления ионов Fe^{+3} проводили гистохимическую реакцию по методу Перлса, после чего докрашивали гематоксилином — эозином. Исследование окрашенных препаратов осуществляли под световым микроскопом Axioscope 40 (Германия).

Результаты исследования. Структура органов животных 3-й группы не отличается от таковой у интактных животных (1-я группа). Реакция Перлса на препаратах всех изученных органов животных 1-й и 3-й группы была отрицательной.

На препаратах печени животных 2-й группы на 1-е сутки структура органа не была существенно изменена. Отмечалось полнокровие части центральных и междольковых вен, расширение синусоидных капилляров. На 14-е сутки к указанным дисциркуляторным расстройствам присоединялись дистрофические изменения гепатоцитов, изменённые клетки располагались преимущественно в перипортальных отделах долек. В оба срока клетки Купфера давали положительную реакцию Перлса. На 14-е сутки выявлялись Перлс-положительные промежутки между гепатоцитами.

У животных 2-й группы через 1 сут от начала опыта структура лёгкого не была изменена. В просвете средних и мелких бронхов отмечались эксфолиированные эпителиоциты и их фрагменты. Межалвеолярные перегородки были отёчны, расширены; наблюдалось полнокровие микроциркуляторного русла. Артериальные сосуды спазмированы, вены расширены, отмечался периваскулярный отек. Просвет артерий заполнен однородной оксифильной массой. К 14-м суткам выраженность описанных гемодинамических расстройств уменьшалась. В оба срока исследования в межалвеолярных перегородках и перибронхиально располагались скопления альвеолярных макрофагов, дающих положительную реакцию

Перлса. Перлс-положительные макрофаги обнаруживались также в просвете альвеол.

В почках животных 2-й группы через 1 сут от начала опыта наблюдали умеренное расширение капсул клубочков и отёк интерстиция. Просвет проксимальных и дистальных извитых канальцев был расширен, в нем располагался клеточный детрит, эпителий уплощен. В дистальных извитых канальцах встречались единичные цилиндры. На 14-е сутки выраженность дисциркуляторных расстройств усиливалась; наблюдалось значительное расширение просвета капсулы клубочка и клубочковых капилляров, отек интерстиция. В интерстициальной соединительной ткани встречались единичные Перлс-положительные макрофаги.

В печени животных 4-й группы через 1 сут после введения магнитолипосом междольковые артерии были спазмированы, а венозные сосуды заустевали. Некоторые междольковые вены полнокровны и расширены, гепатоциты не имели признаков повреждения. Отмечено скопление Перлс-положительных клеток преимущественно в области триад. На 14-е сутки в печени животных 4-й группы отмечено неравномерное расширение синусоидных сосудов, расширение центральных и полнокровие междольковых вен. Гепатоциты всех отделов долек находились в состоянии зернистой

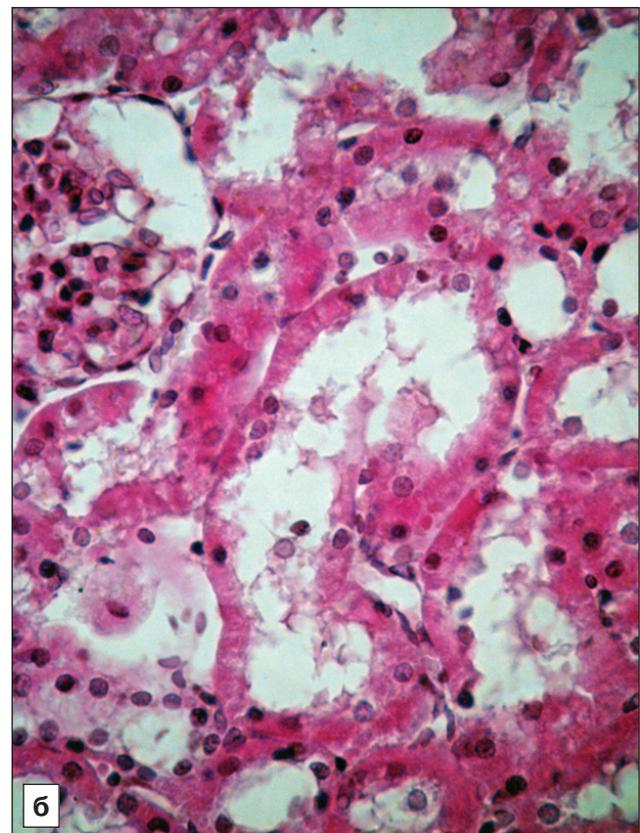
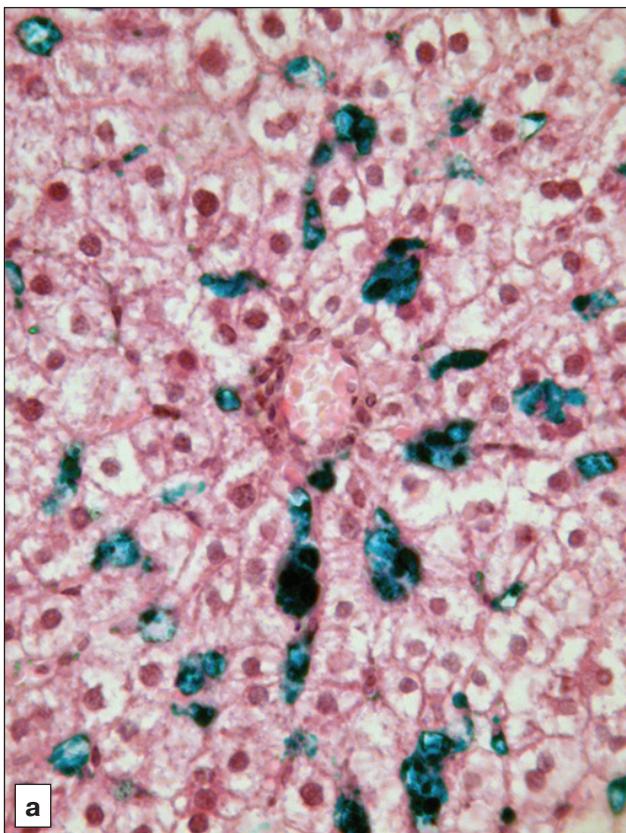


Рис. 1. Печень (а) и почка (б) крысы через 14 сут после внутривенного введения магнитолипосом.

а — дистрофические изменения гепатоцитов; Перлс-положительные структуры в печеночной долке; б — некроз эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев. Метод Перлса, гематоксилин — эозин. а — об. 40, ок. 10; б — об. 20, ок. 10.

дистрофии (рис. 1, а). Встречались участки мелкоочагового некроза. В области триад наблюдались лишь единичные Перлс-позитивные клетки. Промежутки между гепатоцитами давали Перлс-позитивную реакцию.

В легком животных 4-й группы на 1-е сутки межальвеолярные перегородки отечны, повсеместно отмечались полнокровие венозных сосудов, спазм артерий и периваскулярный отек, просвет артериальных сосудов заполнен однородной массой, интенсивно окрашивающейся эозином. В них отмечалось краевое стояние лейкоцитов. В просвете бронхов, перибронхиально и в межальвеолярных перегородках выявлялись Перлс-позитивные клетки (рис. 2). По своему строению легкое крыс на 14-е сутки после введения магнитолипосом соответствовало легкому животных 1-й группы. При этом в строме органа сохранялось большое количество Перлс-позитивных клеток.

На 1-е сутки после инъекции магнитолипосом было отмечено умеренное расширение просвета капсулы клубочков. В просвете проксимальных прямых канальцев и нисходящих отделов петли нефрона имелись цилиндры. На 14-е сутки в корковом веществе наблюдался некроз проксимальных извитых канальцев (см. рис. 1, б). Отмечены расширение капилляров в сосудистом клубочке и значительное расширение просвета его капсулы. Просвет проксимальных и дистальных извитых канальцев был расширен, эпителий уплощен. Единичные Перлс-позитивные клетки располагались в межканальцевой соединительной ткани (см. рис. 1, б).

Обсуждение полученных данных. Сходство морфологических изменений в исследованных органах у животных 2-й и 4-й группы объясняется влиянием ультрадисперсных частиц Fe_3O_4 , содержащихся во вводимых данным группам растворах. Разная степень выраженности эффектов, вероятно, определяется различием в структуре магнитолипосом и наночастиц.

Гемодинамические изменения, возникающие в печени, вызывают гипоксическое повреждение гепатоцитов, морфологически проявляющееся их дистрофией. Нарастание дистрофических изменений к 14-м суткам можно объяснить усугублением гипоксии, а также присоединением токсического повреждения клеток печени. Помимо гипоксического и токсического повреждений, возможен перекисный тип повреждения гепатоцитов с участием наночастиц. Так, показано участие наночастиц Fe_3O_4 в образовании гидроксильных радикалов из эндогенного пероксида водорода [8].

Внутривенное введение наноматериала вызывает развитие гемодинамических нарушений в легком, а также, вероятно, изменения реологических свойств крови, которые морфологически про-

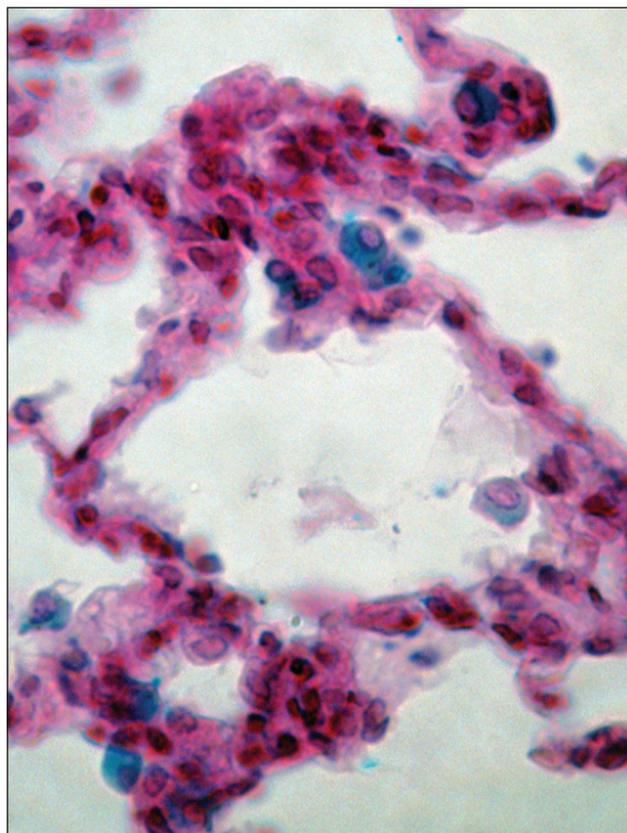


Рис. 2. Легкое крысы через 1 сут после внутривенного введения магнитолипосом.

Перлс-позитивные клетки (элементы системы мононуклеарных фагоцитов) в просвете альвеол и межальвеолярных перегородках. Метод Перлса, гематоксилин — эозин. Об. 40, ок. 10.

являются наличием в просвете сосуда однородной массы (эритроциты отсутствовали), интенсивно окрашивающейся эозином [2]. Можно предположить, что такие изменения в лёгких снижают эффективность газообмена и провоцируют системные ишемические изменения.

Так как почки участвуют в фармакокинетике наночастиц, можно предположить, что изменение их структуры влечет за собой не только нарушение функции самого органа, но и всего организма в целом (через изменение водно-электролитного баланса и накопление токсических продуктов обмена).

При гистохимической реакции на Fe^{+3} положительная реакция получена в клетках системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) печени, легкого и почек.

Расположение Перлс-позитивных макрофагов в легком: перибронхиально, в межальвеолярных перегородках, а также в просвете альвеол и бронхов позволяет предположить механизм удаления наноматериала из организма крысы путем миграции этих клеток в просвет бронхиального дерева.

Скопление Перлс-позитивных клеток печени к 14-м суткам в области триад является проявлением

миграции клеток Купфера от синусоидных сосудов к желчевыводящим путям портальных трактов. При анализе препаратов печени обнаружена Перлс-позитивная реакция в промежутках между гепатоцитами, которые идентифицированы как расширенные жёлчные капилляры. Литературные данные свидетельствуют о возможности транспорта наночастиц гепатоцитами по механизму транцитоза в просвет желчных капилляров [6].

В печени и легком к 14-м суткам количество Перлс-положительных клеток уменьшается по сравнению с таковым в 1-е сутки как во 2-й, так и в 4-й группе, что указывает на наличие механизмов элиминации наночастиц в организме крыс.

Сохранение положительной реакции Перлса на препаратах печени, легкого и почек в течение 14 сут после введения наночастиц и магнитолипосом свидетельствует о низкой скорости выведения наночастиц Fe_3O_4 из организма крысы. Сроки данного эксперимента не позволили установить время, в течение которого происходит полное выведение наноматериала из организма животного.

Менее интенсивную гистохимическую реакцию в печени и легком у крыс при внутривенном введении магнитолипосом, по сравнению с таковой при введении раствора нанопорошка, можно объяснить более низкой концентрацией наночастиц Fe_3O_4 в препарате магнитолипосом [5 мг (Fe_3O_4)/мл], что объясняется задержкой части наночастиц фильтром экструдера, а также наличием в препарате полых липосом, которые активируют и загружают макрофагальную систему, но не оказывают патогенного действия и не выявляются при реакции по методу Перлса.

Итак, внутривенное введение крысам стандартизированного раствора нанопорошка Fe_3O_4 и магнитолипосом, приготовленных на его основе, вызывает сходные морфологические изменения в печени, лёгком и почках у крыс в этих двух группах на 1-е и 14-е сутки, что свидетельствует о единой их этиологии.

Таким образом, повреждающее действие магнитолипосом полностью обусловлено содержащимися в них наночастицами Fe_3O_4 . Внутривенное введение крысам магнитолипосом сопровождается накоплением наночастиц в клетках СМФ печени, легких и почек, а также развитием морфологических изменений (гемодинамические расстройства, дистрофические и некротические изменения эпителиальных клеток), выраженность которых в печени и почках нарастает к 14-м суткам исследования. Данные изменения могут являться как результатом непосредственного действия наночастиц на клетки органов (повреждение мембран клеток, сорбция на мембранах, денатурирующее действие на мембранные и цитозольные белки и т.д.), так и быть опосредованными (нарушение

микроциркуляции, активация цитоплазматических белковых систем, освобождение клеточных медиаторов, инициация свободнорадикальных процессов и т.д.) и вызывать ишемическую, токсическую или рецептор-опосредованную гибель клеток [5, 8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсуков Л.И. Липосомы. Соросовский образовательный журн., 1998, № 10, с. 1–9.
2. Зербино Д.Д. и Лукасевич Л.Л. Диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови. М., Медицина, 1989.
3. Каплун А.П., Шон Ле Банг и Краснопольский Ю.М. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ. Вопр. мед. химии, 1999, т. 45, вып. 1, с. 19–26.
4. Мильто И.В., Михайлов Г.А., Ратькин А.В. и Магаева А.А. Влияние наноразмерных частиц на морфологию внутренних органов мыши при внутривенном введении раствора нанопорошка Fe_3O_4 . Бюл. сиб. мед., 2008, № 1, с. 32–36.
5. Ito A., Shincal M., Honda H. and Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. J. Biosci. Bioengin., 2005, v. 100, p. 1–11.
6. Kreyling W.G., Semmler M. and Erbe F. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. J. toxicol. Environ. Health, 2001, v. 2, № 4, p. 67–78.
7. Martina M.S., Fortin J.P. and Menager C. Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging. J. Am. Chem. Soc., 2005, v. 127, № 30, p. 10676–10685.
8. Nel A., Xia T., Madler L. and Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science, 2006, v. 311, p. 622–627.
9. Rosi N.L. and Mirkin C.A. Nanostructures in biodiagnostics. J. Am. Chem. Soc., Chem. rev., 2005, v. 105, № 4, p. 1547–1562.

Поступила в редакцию 08.10.08
Получена после доработки 09.12.08

LIVER, KIDNEY AND A LUNG STRUCTURE IN RATS AFTER INTRAVENOUS MAGNETOLIPOSOME ADMINISTRATION

I.V. Mil'to and A.N. Dziuman

This work examines the effect of magnetoliposomes on the basis of Fe_3O_4 nanoparticles following different time intervals after their single intravenous injection, on the liver, kidney and lung structure in rats. Sections were stained with hematoxylin and eosin, and Perls method was used to demonstrate Fe^{+3} ions. It was shown that shortly after intravenous injection of magnetoliposomes, hemodynamic disturbances developed in all the organs studied, which by day 14 were aggravated by focal necroses and dystrophic changes in the liver and kidneys. Accumulation of nanoparticles in the cells of mononuclear phagocyte system of these organs was demonstrated. Damaging effect of magnetoliposomes on liver, kidney and a lung structure was established, which was caused by ultradisperse Fe_3O_4 particles contained in them. The consequences of this influence for the rat organism at the time periods exceeding the duration of our experiment, may hardly be predicted.

Key words: *Fe₃O₄ nanoparticles, magnetoliposomes, liver, kidney, lung.*

Department of Morphology and General Pathology, Central Scientific Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk.