

Влияние наноразмерных частиц на морфологию внутренних органов мыши при внутривенном введении раствора нанопорошка Fe_3O_4

Мильто И.В.¹, Михайлов Г.А.¹, Раткин А.В.¹, Магаева А.А.²

Influence nanoparticles on morphology of internal organs of the mouse at intravenous introduction of a solution nanopowder Fe_3O_4

Milto I.V., Mikhaylov G.A., Ratkin A.V., Magaeva A.A.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Институт мониторинга климатических и экологических систем ТНЦ СО РАН, г. Томск

© Мильто И.В., Михайлов Г.А., Раткин А.В., Магаева А.А.

Исследовано влияние наноразмерных частиц Fe_3O_4 на морфологию жизненно важных органов мыши после однократного внутривенного введения раствора нанопорошка Fe_3O_4 . Установлено изменение морфологии изученных органов, что свидетельствует о компенсаторных реакциях организма мышей на внутривенное введение нанопорошка, исход которых на данном этапе трудно прогнозировать.

Ключевые слова: нанопорошок и наночастицы Fe_3O_4 , морфология внутренних органов.

The influence nanoparticles Fe_3O_4 on morphology of the vital organs of the mouse after unitary intravenous introduction of a solution nanopowder Fe_3O_4 has been investigated. Change of morphology of the studied organs has been established, it testifies about adaptive reactions of an organism of mice to intravenous introduction nanopowder which outcome at the given stage is difficult for predicting.

Key words: nanopowder and nanoparticles Fe_3O_4 , morphology internal organs.

УДК 615.456:615.032.14:591.4:599.323.4

Введение

В последние годы отмечается быстрый рост научного, промышленного и коммерческого интереса к наноматериалам. К этому классу относят материалы с размером элементов менее 100 нм. Они производятся в различных формах: нанопорошки, нановолокна, нанопленки, нанотрубки и т.д. [1, 4]. Интерес к наноматериалам связан с изменением ряда основных и появлением новых свойств у традиционных материалов, при их переходе в ультрадисперсное состояние [2].

Уникальные свойства наночастиц, такие как высокая поверхностная энергия, устойчивая сорбция биомолекул, изменение физико-химических свойств наночастиц под действием физических полей, малые размеры, сопоставимые с биомолекулами, наличие магнитных свойств, биосовместимость открывают широкие перспективы для использования наноматериалов в терапии различных заболеваний, в том числе онкологических [5, 10]. Основной проблемой лечения онкологических больных являются побочные эффекты препаратов, используемых в химиотерапии. Разработка новых методов целевой доставки лекарственных средств для лечения онкологических больных является одним из приоритет-

ных направлений онкофармакологии последнего десятилетия. Развитие нанобиотехнологии открывает новые подходы к решению этой проблемы и предполагает тесное сотрудничество ученых на стыке материаловедения, биологии и медицины [7].

Значительный раздел исследований в области наномедицины посвящен созданию принципиально новых лекарственных средств, основанных на использовании наночастиц в качестве носителя в системах целевой доставки лекарственных препаратов в ткани- и клетки-мишени, а также как самостоятельных терапевтических агентов, например при резонансной гипертермии [8].

Внедрение наноматериалов в медицинскую практику позволит создать на их основе новые биосовместимые материалы, имплантаты, методы диагностики и терапии. Активно развивается направление, базирующееся на использовании магнитных свойств нанопорошков для целевой доставки лекарственных средств в органы- и клетки-мишени с помощью внешнего источника постоянного магнитного поля (магнитное нацеливание наноконструкций) [6].

Прежде чем говорить о применении наноматериалов в медицинской практике следует детально и всесторонне изу-

Мильто И.В., Михайлов Г.А., Раткин А.В., Магаева А.А.

Влияние наноразмерных частиц на морфологию...

чить их свойства как с материаловедческой, так и с биомедицинской стороны. Необходимо выяснить механизмы взаимодействия наноматериалов с клетками организма, а также пути их преобразования и выведения. Только комплексное междисциплинарное изучение наноматериалов поможет приблизить достижения нанотехнологической отрасли к широкому внедрению в медицинскую практику. Решение проблем, связанных с производством наноматериалов для конкретных медицинских целей, т.е. материалов с заданным набором свойств, а также создание на их основе фармакоконструкций с прогнозируемыми последствиями для организма после их применения, откроет новые перспективы в лечении и диагностике многих заболеваний и является приоритетным направлением современной нанобиотехнологии.

Описание и определение механизмов формирования отдаленных последствий применения наноматериалов в лечебных и диагностических целях на сегодняшний день остается открытой проблемой для специалистов всего мира [9].

Целью данной работы являлось изучение влияния наноразмерных частиц Fe_3O_4 на морфологию жизненно важных органов мыши и выявление последствий после однократного внутривенного введения раствора нанопорошка Fe_3O_4 .

Материал и методы

В работе использовали нанопорошок Fe_3O_4 , полученный механохимическим способом в отделе структурной макрокинетики Института мониторинга климатических и экологических систем ТНЦ СО РАН (г. Томск). Методом электронной микроскопии установлено, что частицы данного порошка имеют преимущественно сферическую форму и размеры $(10,0 \pm 1,5)$ нм.

Исследование проводилось на 30 беспородных белых мышах-самцах, средняя масса которых составила $(32,4 \pm 5,6)$ г. Животные были разделены на 2 группы: опытная (20 мышей) и контрольная (10 мышей).

Приготовление раствора нанопорошка Fe_3O_4 для внутривенного введения осуществляли специальным способом. Навеску сухого нанопорошка Fe_3O_4 растворяли в стабилизирующем растворе, содержащем цитрат натрия с добавлением 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфониевой кислоты ($\text{pH} = 7,4$). Полученную суспензию подвергали сонификации на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т (Россия), чтобы разрушить агрегаты наночастиц, которые образуются при хранении нанопорошка. Раствор после дезинтеграции под-

вергали центрифугированию с целью осаждения не разрушившихся агрегатов наночастиц. Супернатант (содержит легкую фракцию наночастиц, т.е. свободные частицы и их небольшие ассоциаты) отбирали, и использовали для внутривенного введения мышам, с одной стороны, а с другой проводили его стандартизацию (определяли концентрацию железа в стабилизирующем растворе, а также размер наночастиц). Концентрация железа в супернатанте определена методом атомно-эмиссионного спектрального анализа. Для внутривенного введения использовали раствор нанопорошка Fe_3O_4 с концентрацией железа $(4,8 \pm 1,2) \cdot 10^{-3}$ г/мл, т.е. ~ 5 мг/мл, в пересчете на вес нанопорошка 7 мг/мл. Методом лазерной дифракции установлено, что линейный размер наночастиц Fe_3O_4 в растворе после центрифугирования не превышает 90 нм.

Опытным животным внутривенно вводили стабилизированный раствор нанопорошка Fe_3O_4 на основе цитрата натрия в объеме 1 мл ($0,23$ г Fe_3O_4 на 1 кг массы тела). Контрольным животным вводили стабилизирующий раствор на основе цитрата натрия в том же объеме. Выведение животных из эксперимента проводили методом декапитации через 24 ч и через 14 сут после введения раствора нанопорошка, в количестве 10 опытных и 5 контрольных животных.

Для гистологического исследования были взяты печень, почка и легкое животного. Печень — основной орган детоксикации, который может участвовать в элиминации наночастиц. Наличие различных механизмов инактивации ксенобиотиков позволяет предположить, что печень участвует в фармакокинетике наночастиц, а следовательно может являться органом-мишенью.

Почки — основной орган выделения, обеспечивающий выведение наночастиц из организма, в связи с этим возникает необходимость контроля за их состоянием. Наличие в легких макрофагов заставляет обратить внимание на возможность фагоцитоза наночастиц и их кумуляцию в макрофагах.

Животных на протяжении всего эксперимента содержали в условиях, соответствующих требованиям.

Проводку гистологического материала осуществляли стандартным методом по Меркулову [3]. Исследованные органы заключали в парафин, из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином [3].

Результаты

При визуальном осмотре изучаемых внутренних органов животных макроскопических изменений последних не отмечено.

Всего проанализировано 90 препаратов внутренних органов мыши (печень, легкое, почка), окрашенных гематоксилином и эозином.

Паренхима печени животных контрольной группы (и на 1, и на 14 сут) имеет обычный вид. Гепатоциты окрашены равномерно. Ядра располагаются центрально, структура хроматина сетчатая, мелкодисперсная. Строма контрольных препаратов печени представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью, сосуды без особенностей.

На препаратах легкого мышей контрольной группы слизистая бронхиального дерева представлена однослойным многоядным мерцательным эпителием. Альвеолы выстланы однослойным плоским эпителием.

В междольковых перегородках встречаются единичные макрофаги. Строма легкого имеет обычный вид.

При окраске гематоксилином и эозином в препаратах почки животных контрольной группы четко определяется корковое и мозговое вещество. Корковое вещество представлено почечными тельцами и различными отделами извитых канальцев. В почечных тельцах четко определяется сосудистый клубочек. Между листками капсулы Шумлянско-Боумана наблюдается просвет. Изменений со стороны стромы нет.

На препаратах печени животных опытной группы, выведенных из эксперимента через 1 сут (рис. 1), было выявлено, что структура печени существенно не нарушена. Некоторые гепатоциты печеночных долек находятся в состоянии зернистой дистрофии, измененные гепатоциты лежат преимущественно в перипортальных и промежуточных отделах долек. Печеночные дольки без измененных гепатоцитов практически не встречаются. Центральные вены полнокровны. В некоторых венах отмечаются не только признаки полнокровия, но и краевое стояние лейкоцитов. Синусоидные капилляры расширены, между ними и гепатоцитами лежат отдельные эритроциты. Ядра у гепатоцитов в состоянии дистрофии фиолетовые, структура хроматина глыбчатая. Наблюдается умеренное количество двуядерных гепатоцитов. Строма печени без особенностей.

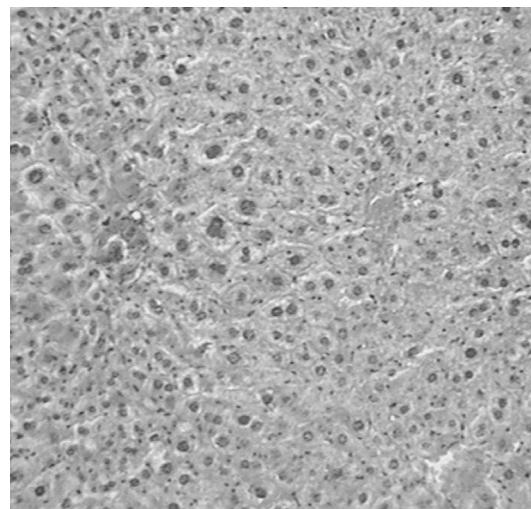


Рис. 1

На препаратах печени животных опытной группы, выведенных из эксперимента через 14 сут (рис. 2), наблюдаются значительные изменения структуры печени.

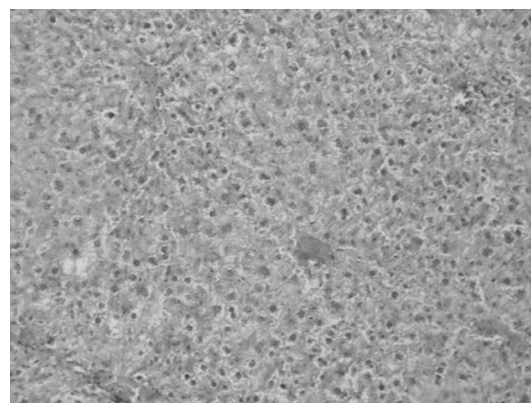


Рис. 2

Дистрофические изменения выражены повсеместно, во всех печеночных дольках. Большинство гепатоцитов печеночных долек находится в состоянии зернистой дистрофии. Дистрофические изменения в цитоплазме характеризуются образованием большого количества мелких гранул. Изменения захватывают печеночные клетки в перипортальных, промежуточных и периферальных отделах долек. Центральные и междольковые вены резко полнокровны. В венах отмечается краевое стояние лейкоцитов. Синусоидные капилляры расширены на всем протяжении, между ними и гепатоцитами наблюдаются кровоизлияния. Цитоплазма гепатоцитов розового цвета, ядра фиолетовые, хроматин имеет глыбчатую структуру. Изменений со стороны стромы нет.

На препаратах легкого животных опытной группы, выведенных из эксперимента через 1 сут, просвет бронхиол свободен, эпителий не имеет признаков повреждения. Межальвеолярные перегородки у 70% мышей отечны, расширены, в просвете альвеол отмечается небольшое количество транссудата, венозные сосуды полнокровны. Лейкоцитарной инфильтрации стромы легких нет.

На препаратах легкого животных опытной группы, выведенных из эксперимента через 14 сут (рис. 3), структура легкого сохранена. Просвет бронхиол свободен, эпителий не поврежден. Межальвеолярные перегородки у 80% мышей отечны, в просвете альвеол отмечается небольшое количество транссудата. Повсеместно выявлено утолщение межальвеолярных перегородок. В строме легкого в сравнении с группой контроля на всех препаратах повышено содержание макрофагов. Наблюдается венозное полнокровие. Строма отечна. Лейкоцитарной инфильтрации стромы легких нет.

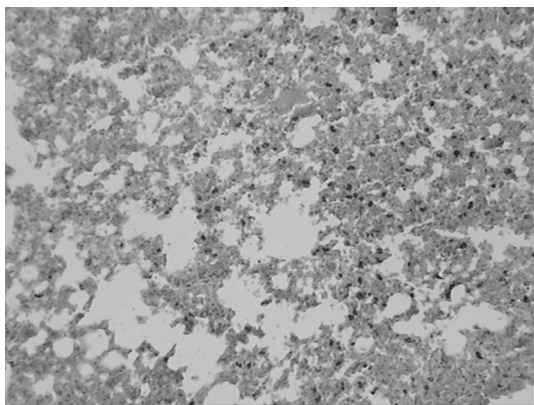


Рис. 3

На препаратах почки животных опытной группы, выведенных из эксперимента через 24 ч (рис. 4) и 14 сут, структура коркового и мозгового вещества имеет нормальное строение. Скоплений экссудата не обнаружено, клеточной инфильтрации нет. Умеренное расширение капсул Шумлянско—Боумана, отек интерстиция, венозное полнокровие сосудов мозгового вещества. Дистрофических изменений и некроза эпителия канальцев почки не отмечено. В дистальных извитых канальцах встречаются единичные цилиндры.

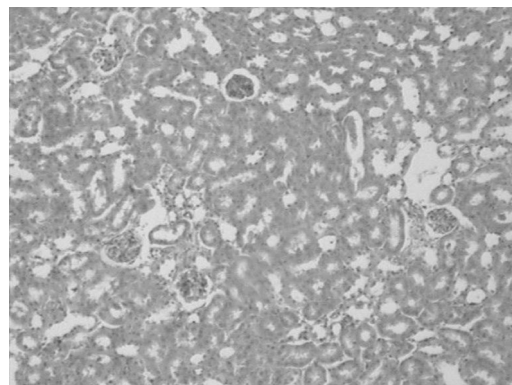


Рис. 4

Обсуждение

Препараты окрашивались гематоксилином и эозином для контроля гистологической структуры органов и выявления в них возможных типовых патологических процессов (воспаление, некроз, опухоль и т.д.), вызванных непосредственным воздействием наночастиц Fe_3O_4 на клетки, либо опосредованным, например ишемией, вследствие эмболии сосудов агрегатами наночастиц, которые могут образоваться при изменении коллоидной устойчивости последних при попадании в кровеносное русло.

Рутинная окраска препаратов является самой распространенной и наиболее информативной в современной гистологии, она позволяет обнаружить изменения гистологической структуры и идентифицировать широкий круг патологических процессов в различных тканях.

Изменения в печени выражены наиболее ярко по сравнению с другими исследованными органами, что может быть связано с активным ее участием в фармакокинетике наночастиц Fe_3O_4 . Расширение синусоидов, диапедезные кровоизлияния в пространство Диссе, краевое стояние лейкоцитов, а также венозная гиперемия свидетельствуют о нарушениях в микроциркуляторном русле, связанных с затруднением оттока крови. В этих условиях возможно возникновение дефицита кислорода и гипоксическое повреждение гепатоцитов, морфологически проявляющееся паренхиматозной дистрофией. Нарастание степени выраженности дистрофии к 14 сут (вовлечение в процесс большего количества клеток и расширение региона повреждения в дольках) можно объяснить нарастающими гипоксическими явлениями, а также присоединением вследствие нарушения метаболизма гепатоцитов токсического повреждения клеток печени.

Увеличение содержания макрофагов в межальвеолярных перегородках, в сравнении с группой контроля, может свидетельствовать о поглощении и накоплении ими в цитоплазме наночастиц Fe_3O_4 . Наличие в просвете альвеол транссудата связано с нарушением микроциркуляции и повышением проницаемости аэрогематического барьера. Эти изменения могут быть вызваны как непосредственным повреждающим воздействием наночастиц на альвеолоциты и эндотелий, так и опосредованным, через факторы, выделяемые активированными макрофагами и клетками соединительной ткани. Венозное полнокровие и отек интерстициальной соединительной ткани вызывают утолщение межальвеолярных перегородок. Можно предположить, что подобные изменения в легких снижают эффективность газообмена и уменьшают насыщение крови кислородом, что может спровоцировать системные ишемические изменения.

При анализе микропрепаратов почек животных опытной группы не выявлены различия между их структурой на 1-е и 14-е сут после введения раствора нанопорошка Fe_3O_4 . Наличие венозной гиперемии в мозговом веществе и отека стромы свидетельствуют о реакции данного органа на введенные в системную циркуляцию наноразмерные частицы Fe_3O_4 . В группе контроля подобные изменения не встречались. Почки являются главным органом выделения организма (в том числе и наночастиц), поэтому контроль за их состоянием и процессами, развивающимися в них на фоне введения наноматериалов, является обязательным этапом исследования взаимодействия организма с наночастицами. Ввиду того, что почка участвует в фармакокинетике наночастиц, можно предположить, что нарушение структуры этого органа может повлечь за собой не только нарушение его функции, но и всего организма в целом (через нарушение водно-электролитного баланса и накопление токсических продуктов обмена).

Заключение

Установлены изменения морфологии жизненно важных внутренних органов (печень, легкое, почка), животных опытной группы на 1-е и 14-е сут при внутривенном введении мышам стандартизованного стабилизированного раствора нанопорошка Fe_3O_4 . Отсутствие факта гибели животных, а

также характер обнаруженных изменений в микроскопической структуре изученных органов свидетельствуют о возможных компенсаторных реакциях организма мышей на внутривенное введение нанопорошка Fe_3O_4 , исход которых на данном этапе трудно прогнозировать. Данные изменения могут являться как результатом непосредственного действия наночастиц на клетки органов, так и быть опосредованными (нарушение микроциркуляции, активация плазменных белковых систем, освобождение клеточных медиаторов и т.д.), которые вызывают ишемическое, токсическое или рецептор-опосредованное повреждение клеток.

Несмотря на широкое экспериментальное применение наночастиц, на сегодняшний день, вероятно, недостаточно внимания уделено вопросам кинетики и элиминации наночастиц в живом организме, а также возможным токсическим эффектам, связанным с введением наночастиц оксидов металлов в системный кровоток как непосредственно после инъекции, так и в отдаленные сроки. В связи с этим, в будущем особое внимание следует уделить изучению отдаленных последствий внутривенного введения наночастиц, так как наночастицы, вероятно, способны накапливаться во внутренних органах, приводя к непредсказуемым последствиям.

Литература

1. Гусев А.И. Нанокристаллические материалы: методы получения и свойства. Екатеринбург, 1998. 200 с.
2. Гусев А.И., Ремпель А.А. Нанокристаллические материалы. М.: Физматлит, 2001. 224 с.
3. Микроскопическая техника / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. М.: Медицина, 1996. 544 с.
4. Новые материалы / Под ред. Ю.С. Карабасова. М.: МИСИС, 2002. 738 с.
5. Суздальев И.П. Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов. М.: КомКнига, 2006. 592 с.
6. Levy L., Sahoo Y., Kim K.S. et al. Nanochemistry: synthesis and characterization of multifunctional nanoclinics for biological applications, 2002.
7. Meyer M., Kuusi O. Nanotechnology: generalizations in an interdisciplinary field of science and technology. 2004. V. 2. P. 153—168.
8. Nathaniel L. Rosi and Chad A. Mirkin. Nanostructures in bionanotechnology. Chem. Rev., 2005.
9. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environmental Health Perspectives, 2005.
10. Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine // J. of physics: applied physics, 2003.

Поступила в редакцию 10.12.2007 г.