

УДК 537.622.4:57.085:591.4:599.323.4:576.6:576.33:577.29:615

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ И ОРГАНАХ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС С ПЕРЕВИВАЕМЫМ РАКОМ ПЕЧЕНИ РС-1 ПРИ ВНУТРИБРЮШИННОМ ВВЕДЕНИИ ЦИТРАТ-СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА

Кун Сян Мяо

ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России», Саратов,
e-mail: navolokin1@rambler.ru

Проведено морфометрическое и морфологическое изучение тканей внутренних органов, опухоли лабораторных крыс с привитым альвеолярным раком печени (холангиома) РС-1 при однократном и многократном внутрибрюшинном введении гидрозолей магнетита, стабилизированных цитратной оболочкой. Получены данные о нецелесообразности и неэффективности применения внутрибрюшинного метода введения наночастиц железа, стабилизированных цитратом, для визуализации и последующей гипертермией магнитным полем из-за отсутствия накопления наночастиц железа в ткани опухоли. Обнаружено, что наночастицы вызывают в органах изменения кровенаполнения и откладываются в печени, селезенке, сердце, легких, лимфоузлах, а также приводят к изменению структуры иммунокомпетентных органов (селезенка). Выраженность изменений в органах в большей степени зависит от величины вводимой дозировки, чем от длительности введения.

Ключевые слова: наночастицы железа, перевиваемая опухоль, рак печени, нанотехнологии, токсичность, морфология

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE TISSUES AND ORGANS IN LABORATORY RATS WITH TRANSPLANTABLE LIVER CANCER PC-1 AT INTRAPERITONEAL INJECTION OF CITRATE STABILIZED IRON NANOPARTICLES

Kong X.M.

Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: navolokin1@rambler.ru

Morphological and morphometric study of the tissues of the internal organs, tumors of rats with transplanted liver cancer PC-1 was performed at the single and repeated intraperitoneal administration of magnetite hydrosol stabilized by citrate. The data were obtained about the inexpediency of application intraperitoneal administration of citrate stabilized iron nanoparticles for visualization and subsequent magnetic therapy and the lack of accumulation of nanoparticles in the tumor. It was found that nanoparticles cause changes in the blood supply of organs and are deposited in the liver, spleen, heart, lungs, lymph nodes, as well as lead to a change in the structure of immune organs. Intensity of changes in the organs depends more on the size of injected dose than the duration of administration.

Keywords: iron nanoparticles, transplantable tumor, cancer of the liver, nanotechnology, toxicity, morphology

Магнитные наночастицы (НЧ), в частности, оксидов железа, широко используются для биомедицинских целей *in vivo*, например, для усиления контрастирования и повышения диагностической чувствительности в МРТ [6, 7], целевой доставки и специфического связывания терапевтических агентов в биоткани [8], гипертермии с помощью переменного магнитного поля, тканевой инженерии [2, 10]. В настоящее время недостаточно освещены вопросы изучения накопления и морфологических изменений во внутренних органах при однократном и многократном введении НЧ, хотя есть работы, посвященные пероральному, внутримышечному введению стабилизированных НЧ, показавшие, что данные методы неэффективны для диагностики и последующего лечения опухолей и оказывают умеренно выраженный токсический эффект на внутренние органы [1, 3–5, 9]. Целью представленной работы стало изучение морфометрических и морфологических изменений тканей, органов, опухоли лабо-

раторных крыс с перевитым раком печени РС-1 при однократном и многократном внутрибрюшинном введении НЧ железа, стабилизированных цитратом.

Материалы и методы исследования

В эксперименте использованы 24 белые беспородные крысы самцы весом 180–200 г с перевитой опухолью – рак печени РС-1. Крысам вводили внутрибрюшинно стабилизированные цитратом НЧ магнетита со средним размером 23 ± 6 нм [2]. Работа с лабораторными животными осуществлялась согласно протоколу исследований в соответствии с Женевской конвенцией 1985 г. о «Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных» и Хельсинкской декларацией 2000 г. о гуманном отношении к животным.

В первой серии эксперимента каждая из 6 крыс получала по одной внутрибрюшинной инъекции НЧ магнетита в дозировке 700 мг/кг. Во второй серии 6 крысам вводили внутрибрюшинно один раз в сутки в течение 7 дней водный коллоид НЧ магнетита в дозе 250 мг/кг. Дозы были рассчитаны на основании предварительно проведенных экспериментов и литературных данных [2–6]. Используемые дозировки не влияли на общее состояние животных и не приводили

ких гибели. Были введены две контрольные группы сравнения, состоявшие из 6 крыс, которые в каждой получали внутривенно инъекцию 1 мл физиологического раствора однократно и в течение 7 дней. Соответственно. Для контроля накопления НЧ в опухоли и органах животных проводили МРТ через 24 часа после последнего введения НЧ в соответствии с описанным дизайном эксперимента на высокопольном томографе PhilipsAchieva 1.5T с использованием фазированной катушки. Имобилизацию животных проводили в положении на спине с фиксацией конечностей, в каждом случае длительность ее составляла 60 мин. Для наркоза вводили внутримышечно золетил в концентрации 40 мг/кг веса животного. После проведения МРТ все животные выводились из эксперимента путем декапитации, после чего проводили забор тканей внутренних органов для гистологического исследования. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Перлсу (для выявления железа). Морфометрию проводили с помощью микровизора μ Vizo-101 (ЛОМО).

Нормальность распределений полученных данных была подтверждена с помощью критерия Колмогорова–Смирнова, после чего отличия между средними в контрольной группе сравнения и опытными оценивали с использованием t-критерия для независимых выборок, различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

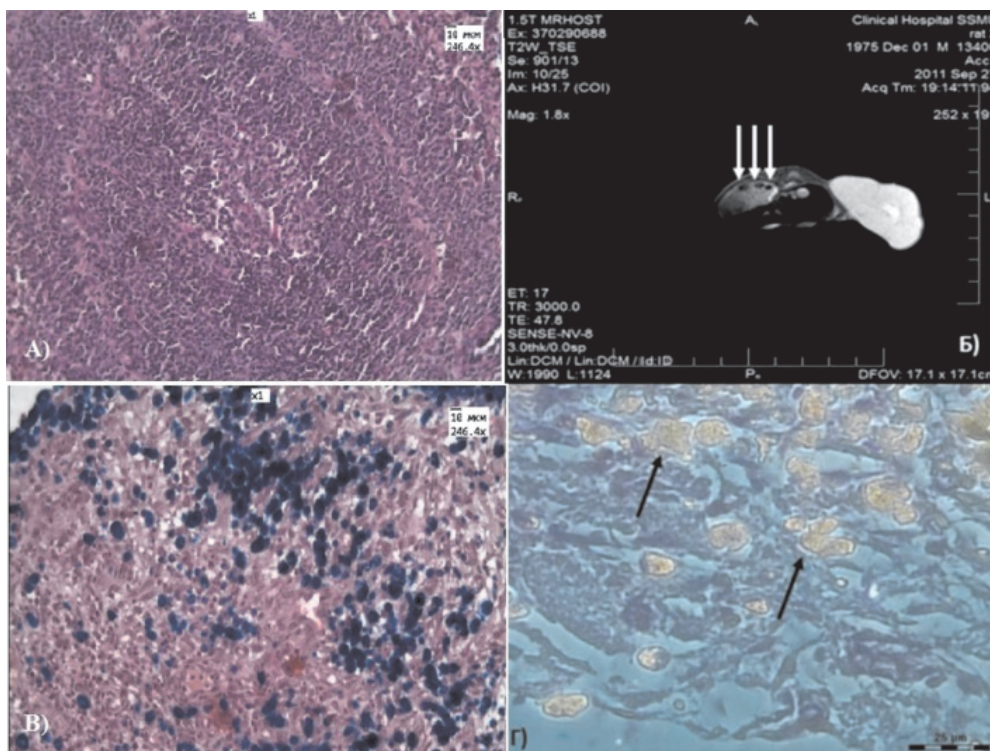
Результаты исследований и их обсуждение

При макроскопическом исследовании на аутопсии обращало на себя внимание

увеличение органов. При однократном введении – печени, почки, сердца, легких, селезенки; при многократном введении – почек, сердца, легких, селезенки.

При многократном введении накопление частиц было настолько значимым в мезентериальных лимфатических узлах, что на 7-е сутки, в последний день эксперимента, при проведении МРТ они были резко контрастны по сравнению с другими органами. На аутопсии лимфоузлы брюшной полости за счет большого скопления НЧ имели темно-коричневый цвет.

При гистологическом исследовании лимфатические узлы имели разную структуру, часть лимфоузлов была сохранена и в них обнаруживались массивные отложения НЧ железа, другая их часть была представлена скоплением зерен черного и коричневого цветов (что возможно обусловлено валентностью железа, входящего в состав НЧ Fe^{2+} или Fe^{3+}), которые при окраски по Перлсу давали реакцию Берлинской лазури. Также отмечали скопление НЧ в виде тяжей по ходу лимфатических сосудов в жировой клетчатке. Скопления НЧ были подтверждены при проведении микроскопии в темном поле в режиме флуоресценции (рисунок).



А – строение селезенки при многократном введении НЧ. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x246; Б – МРТ снимок крысы с раком печени РС-1, справа – опухоль, слева – 3 лимфоузла брюшной полости, накопившие НЧ; В – скопление НЧ железа в лимфатическом узле. Окраска гематоксилином и эозином, с реакцией по Перлсу. Ув. x246; Г – темнопольная микроскопия в режиме фазового контраста. Скопление НЧ светится желтым цветом. Ув. x 600

В печени при однократном и многократном введении НЧ отмечали схожие изменения: в гепатоцитах – зернистую и очаговую гидропическую дистрофию; в просвете сосудов – выраженное полнокровие, феномен сепарации крови, нити фибрина. При многократном введении НЧ, имеющие вид гранул коричневого цвета, обнаруживали в клетках Купфера. При проведении анализа морфометрических данных было выявлено достоверное изменение среднего числа в поле зрения следующих клеточных элементов: при однократном внутрибрюшинном введении

увеличение лейкоцитов на 169%, гепатоцитов – на 17%, суммы всех клеточных элементов в поле зрения – на 22%. Увеличивалось также число гепатоцитов в состоянии некробиоза и некроза на 53,6% по сравнению с группой сравнения. При многократном внутрибрюшинном введении увеличение непаренхиматозных элементов было на 39%, гепатоцитов – на 19%, суммы всех клеточных элементов в поле зрения – на 23% и уменьшение в поле зрения среднего числа гепатоцитов в состоянии некробиоза, некроза на 41% по сравнению с группой сравнения (таблица).

Морфометрические изменения в органах при внутрибрюшинном введении НЧ железа

| Орган | Показатель | Контрольная группа сравнения | Однократное в/бр. введение | Многократное в/бр. введение |
|-----------|--|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Печень | Не паренхиматозные элементы ¹ | 6,17 ± 0,43 | 7 ± 0,43 | 8,6 ± 0,95** |
| | Лейкоциты | 1,52 ± 0,18 | 4,09 ± 0,53** | 1,5 ± 0,39 |
| | Гепатоциты | 35,41 ± 1,54 | 41,63 ± 1,99* | 42,1 ± 1,19* |
| | Сумма клеток в поле зрения | 43,11 ± 1,81 | 52,72 ± 2,05** | 53 ± 2,007** |
| | Кол-во дегенеративных гепатоцитов ² | 10,17 ± 0,68 | 15,63 ± 0,908** | 6,1 ± 1,01** |
| Легкие | S инфильтратов (мм ²) | 0,084 ± 0,0005 | 0,188 ± 0,0033* | 0,048 ± 0,0034*** |
| | P инфильтратов, мм | 1,36 ± 0,008 | 1,84 ± 0,251 | 0,89 ± 0,0307*** |
| | Толщина межальвеолярных перегородок, мм | 0,012 ± 0,0009 | 0,011 ± 0,0011 | 0,0096 ± 0,0006* |
| Почки | S клубочков (мм ²) | 0,0039 ± 0,00018 | 0,0033 ± 0,0002** | 0,0034 ± 0,0001 |
| | P клубочков | 0,232 ± 0,0054 | 0,208 ± 0,009* | 0,22 ± 0,00507* |
| | Высота эпителиоцита | 0,012 ± 0,0003 | 0,014 ± 0,0002*** | 0,011 ± 0,0002 |
| Селезенка | S фолликулов (мм ²) | 0,14 ± 0,01 | 0,15 ± 0,009 | 0,12 ± 0,014 |
| | P фолликулов (мм) | 1,40 ± 0,048 | 1,44 ± 0,055 | 1,21 ± 0,081 |
| | S светлого центра (мм ²) | 0,013 ± 0,002 | 0,024 ± 0,0006*** | 0,044 ± 0,002*** |
| | Толщина маргинальной зоны (мм) | 0,015 ± 0,0011 | 0,014 ± 0,0009 | 0,009 ± 0,0006*** |

Примечания: – различия достоверно отличаются при сравнении значений опытной и контрольной групп при * – $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** – $P < 0,001$;

1 – к непаренхиматозным элементам относили и обобщили в одну группу клетки Купфера, Ито, Рит-клетки; 2 – к дегенеративным гепатоцитам относили безъядерные клетки с разорванной плазмолеммой, а также клетки с ядрами в состоянии кариопикноза, кариорексиса и кариолизиса.

В сердце при однократном и многократном введении НЧ железа обнаруживали сходные изменения: зональный отек стромы, феномен сепарации крови в сосудах, предсердиях. В просвете сосудов наряду с эритроцитами наблюдали скопления НЧ; очаговые и диапедезные периваскулярные кровоизлияния, которые были более выражены при однократном введении (рисунок).

В легких при однократном введении НЧ железа наблюдали статистически достоверное увеличение площади перибронхиальных инфильтратов более чем в 2 раза по сравнению с контролем; увеличение выраженности эмфиземы, при этом значи-

мого изменения средней толщины межальвеолярной перегородки не зафиксировали, в сосудах отмечали феномен сепарации крови. При многократном введении НЧ железа наблюдали значимое истончение межальвеолярных перегородок на 20% по сравнению с контролем и увеличение выраженности эмфиземы. Обращало на себя внимание уменьшение площади перибронхиальных инфильтратов в 2 раза по сравнению с контрольной группой. Между эритроцитами обнаруживали гранулы пигмента гемосидерина. Наблюдали отек и утолщение стенок артерий, полнокровие сосудов с развитием в них феномена сепарации крови (таблица).

В головной мозге при однократном внутривенном введении НЧ железа развивался умеренный отек вещества головного мозга, кровоизлияния в мягкие мозговые оболочки головного мозга и мозжечка. Обнаруживались очаговые участки деструкции вещества головного мозга с развитием субэпидимальной пролиферации глиальных клеток. При длительном внутривенном введении отмечали более выраженное полнокровие сосудов и отек вещества головного мозга; в мозжечке ишемические изменения клеток Пуркиньи в виде лизиса ядер и образованием «клеток-теней» (таблица).

В почках при однократном и многократном введении НЧ наблюдали полнокровие сосудов коркового и мозгового вещества и интерстициальной зоны, феномен сепарации крови в крупных сосудах, зернистую дистрофию эпителия извитых и прямых канальцев. Кровенаполнение клубочков было снижено по сравнению с контролем. При анализе морфометрических показателей в почках отмечали при однократном внутривенном введении статистически значимое уменьшение размеров площади клубочков на 15,5%, периметра – на 11% и увеличение средней высоты эпителиоцитов извитых канальцев на 16% по сравнению с контрольной группой. При многократном внутривенном введении НЧ статистически значимое увеличение размеров клубочков по периметру на 5% (таблица).

В селезенке при однократном введении НЧ железа отмечали, что соотношение красной и белой пульпы составляет 2/1. В фолликулах обнаруживались светлые герминативные центры, площадь которых составляла $0,024 \pm 0,0006 \text{ мм}^2$, что было на 84% больше, чем контрольной группе с перевитой опухолью РС-1. При многократном введении наблюдали преобладание красной пульпы над белой (4/1), при этом границы между красной и белой пульпой были нечеткие, в красной пульпе развивалось выраженное полнокровие. Обращали на себя внимание фолликулы с четкой мантийной зоной, толщиной $0,009 \pm 0,0006 \text{ мм}$, которая была на 40% меньше, чем в контрольной группе. Было установлено статистически значимое увеличение площади светлых центров ($0,044 \pm 0,002 \text{ мм}^2$) на 238% по сравнению с контрольной группой, что свидетельствовало об их гиперплазии. При однократном и многократном введении визуализировали включения черного цвета в клетках красной пульпы, дающие положительную окраску по Перлсу, что может говорить как об увеличении отложения гемоседерина, так и о накоплении НЧ (таблица, рисунок).

Морфологических изменений в ткани опухоли по сравнению с контрольной группой не наблюдалось. Скоплений НЧ не обнаружено ни морфологически, ни методом МРТ.

Заключение

При введении НЧ железа, покрытых цитратом натрия, их скопления отмечаются по ходу введения, а также в лимфатических узлах брюшной полости. При длительном введении скопления НЧ настолько значимы, что лимфатические узлы являются контрастными на МРТ, что также подтверждается данными аутопсии и последующими гистологическими исследованиями. Макроскопически при однократном введении происходит увеличение печени, почек, сердца, легких, селезенки, а при многократном – менее значительное увеличение почек и сердца и более значительное – легких и селезенки. Единичные скопления частиц обнаруживались в сосудах миокарда и клетках Купфера печени, в то время как в опухоли накопление НЧ не подтвердилось ни морфологическими методами, ни данными МРТ. Данные результаты позволяют сделать вывод о нецелесообразности внутривенного метода введения НЧ железа для усиления контрастности опухоли при МРТ.

Установлено, что НЧ железа имеют низкий цитотоксический эффект, так как повреждения паренхиматозных клеток имели обратимый характер, однако вызывают различные виды нарушения кровообращения в виде полнокровия сосудов, феномена сепарации крови, отека, развития диапедезных и очаговых кровоизлияний и появления нитей фибрина в сосудах печени. Анализ морфометрических данных (количество клеток в печени, перибронхиальные инфилтраты в легких, уменьшение площади клубочков в почках, увеличение площади светлых центров в селезенке) свидетельствует о развитии реактивной реакции на острое повреждение.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что однократное введение большой дозировки вызывает более выраженные изменения в органах детоксикации (печень, почки), в то время как длительное введение меньшей дозировки не вызывает цитотоксического эффекта, а приводит к структурным изменениям органов иммуногенеза (лимфоузлы, селезенка).

Список литературы

1. Динамика морфологических и биохимических изменений у лабораторных животных с перевитым раком почки при внутривенном введении золотых нанооболочек / Н.А. Наволокин, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская, Л.В. Сулейманова,

С.М. Кун, Г.С. Терентюк, Н.Г. Хлебцов, Б.Н. Хлебцов // Известия Саратовского государственного университета. Серия Физика. – 2012. – Т. 12, № 2. – С. 37–43.

2. Синтез гидрозолей магнетита и их воздействие на живые системы на клеточном и тканевом уровнях / С.В. Герман, О.А. Иноземцева, Н.А. Наволокин, А.В. Маркин, Е.Е. Пудовкина, П.О.Петров, Е.С.Тучина, А.Б. Бучарская, С.Н. Плескова, Г.К. Маслякова, Д.А. Горин // Российские нанотехнологии. – 2013. – № 7–8. – С. 118–123.

3. Морфологические изменения во внутренних органах лабораторных животных при однократном введении наночастиц Fe / Н.А. Наволокин, О.В. Матвеева, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская, Л.В. Сулейманова, С.М. Кун, Б.А. Медведев, А.А. Игнатъев, Т.В. Бочкарёва // Известия Саратовского государственного университета. Серия Физика. – 2011. – Т. 11, № 2. – С. 62–66.

4. Наволокин Н.А., Кун С.М. Морфологические изменения внутренних органов и головного мозга при пролонгированном пероральном введении наночастиц железа // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7, № 4. – С. 760–762.

5. Применение морфологических методов исследования в наноонкологии / Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская, Н.А. Наволокин, А.А. Широков, А.М. Буров // Вестник биотерапевтического журнала. – 2011. – № 4. – С. 104.

6. Chouly C., Pouliquen D., Lucet I., Jeune J.J., Jallet P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. // J. Microencapsulation. – 1996. – Vol. 13. – P. 245.

7. Gupta A.K., Curtis A.S.G. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25. – P. 3029.

8. Jun Y., Lee J.-H., Cheon J. Chemical Design of Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance Imaging // Angewandte Chemie International Edition. – 2008. – Vol. 47. – P. 5122.

9. Navolokin N.A., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Kong X.M. Morphological changes in the kidney, liver and spleen during prolonged administration of iron nanoparticles // Journal of Physics: Conference Series. – 2012. – Vol. 345. – no. 012043 doi:10.1088/1742-6596/345/1/012043.

10. Reimer P., Weissleder R. Development and experimental application of receptor-specific MR contrast media // Radiology. – 1996. – Vol. 36. – P. 153.

References

1. Dinamika morfoloģicheskih i biokhimicheskih izmeneniy u laboratornykh zhivotnykh s perevitym rakom pochki pri vnutrivennom vvedenii zolotykh nanoobolochek / N.A. Navolokin, G.N. Maslyakova, A.B. Bucharskaya, L.V. Suleymanova, S.M. Kun, G.S. Terentyuk, N.G. Khlebtsov, B.N. Khlebtsov // Izvestiya Saratovskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Fizika. 2012. T. 12, no. 2. pp. 37–43.

2. Sintez gidrozoley magnetita i ikh vozdeystviye na zhivye sistemy na kletochnom i tkanevom urovnyakh/S.V.

German, O.A. Inozemtseva, N.A. Navolokin, A.V. Markin, Ye.E. Pudovkina, P.O.Petrov, Ye.S.Tuchina, A.B. Bucharskaya, S.N. Pleskova, G.K. Maslyakova, D.A. Gorin // Rossyskiye nanotekhnologii. 2013. no. 7–8. pp. 118–123.

3. Morfoloģicheskiye izmeneniya vo vnutrennikh organakh laboratornykh zhivotnykh pri odnokratnom vvedenii nanochastits Fe / N.A. Navolokin, O.V. Matveyeva, G.N. Maslyakova, A.B. Bucharskaya, L.V. Suleymanova, S.M. Kun, B.A. Medvedev, A.A. Ignatyev, T.V. Bochkaryova // Izvestiya Saratovskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Fizika. 2011. T. 11, no. 2. pp. 62–66

4. Navolokin N.A., Kun S.M. Morfoloģicheskiye izmeneniya vnutrennikh organov i golovnogo mozga pri prolongirovannom peroralnom vvedenii nanochastits zheleza //Saratovskiy nauchno-meditsinsky zhurnal. 2011. T. 7. no. 4. pp. 760–762.

5. Primeneniye morfoloģicheskikh metodov issledovaniya v nаноonkologii / G.N. Maslyakova, A.B. Bucharskaya, N.A. Navolokin, A.A. Shirokov, A.M. Burov // Vestnik bioterapevcheskogo zhurnala. 2011. no. 4. pp. 104.

6. Chouly C., Pouliquen D., Lucet I., Jeune J.J., Jallet P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. // J. Microencapsulation. 1996. Vol. 13. pp. 245.

7. Gupta A.K., Curtis A.S.G. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors // Biomaterials. 2004. Vol. 25. pp. 3029.

8. Jun Y., Lee J.-H., Cheon J. Chemical Design of Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance Imaging // Angewandte Chemie International Edition. 2008. Vol. 47. pp. 5122.

9. Navolokin N.A., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Kong X.M. Morphological changes in the kidney, liver and spleen during prolonged administration of iron nanoparticles // Journal of Physics: Conference Series. 2012. Vol. 345. no. 012043 doi:10.1088/1742-6596/345/1/012043.

10. Reimer P., Weissleder R. Development and experimental application of receptor-specific MR contrast media // Radiology. 1996. Vol. 36. pp. 153.

Рецензенты:

Пучиньян Д.М., д.м.н., профессор, заместитель директора по науке, ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава РФ, г. Саратов;

Горин Д.А., д.х.н., профессор, научный руководитель департамента нанотехнологий Образовательно-научного института наноструктур и биосистем, ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 23.08.2013.