

1 – ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет», кафедра морфологии и общей патологии, 634050, Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2, стр. 7

2 – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», лаборатория клеточных технологий, отдел экспериментальной и клинической кардиологии, 650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

3 – ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», кафедра биотехнологии и органической химии, 634050, Россия, г. Томск, пр-т Ленина, 30

4 – ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, 634050, Россия, г. Томск, пр-т Ленина, 36

1 – Department of morphology and general pathology of Siberian State Medical University, 2/7, Moskovskiy trakt, Tomsk, 634050, Russia

2 – Laboratory of ultrastructural methods of investigating of tissues, department of experimental and clinical cardiology, institute of complex problems of cardio-vascular diseases of Siberian department of Russian Academy of Medical Science, 6, Sosnovyi blv., Kemerovo, 650002, Russia

3 – Department of biotechnology and organic chemistry of National Research Tomsk Polytechnic University, 30, Lenin av., Tomsk, 634050, Russia

4 – Laboratory of translational cellular and molecular biomedicine, Tomsk State University, 36, Lenin av., Tomsk, 634050, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: mitrof@mail.ru

УЛЬТРАСТРУКТУРА ПЕЧЕНИ И ЛЕГКИХ КРЫС ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ МАГНИТОМИЦЕЛЛ НА ОСНОВЕ ПОКРЫТЫХ УГЛЕРОДОМ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА

Г.Ю. Васюков^{1,2}, И.В. Мильто^{1,3}, И.В. Суходоло¹,
И.В. Митрофанова^{1,4*}

Резюме. Изучено влияние магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа после однократного внутривенного введения их водных суспензий на ультраструктуру печени и легких крыс. Выведение животных из эксперимента проводили через 1 и 40 суток после инъекции суспензий наноматериала. Ультраструктурное исследование печени и легких крыс проводили с помощью трансмиссионного электронного микроскопа. Отсутствие изменений гепатоцитов, пневмоцитов, мононуклеарных фагоцитов, а также азрогематического барьера указывает на отсутствие выраженного токсического действия исследуемого модифицированного наноматериала на легкие и печень.

Ключевые слова: магнитомицеллы, наночастицы железа, поверхностная модификация, трансмиссионная электронная микроскопия.

ULTRASTRUCTURE OF RAT LIVER AND LUNGS AFTER SINGLE INTRAVENOUS INJECTION OF MAGNITOMICELLS BASED CARBON-COATED IRON NANOPARTICLES

G.U. Vasukov^{1,2}, I.V. Milto^{1,3}, I.V. Sukhodolo¹, I.V. Mitrofanova^{1,4*}

Abstract. In this study the effect of magnitomicells based on carbon encapsulated iron nanoparticles on the ultrastructure of rat's liver and lungs after intravenous injection of their aqueous suspensions was investigated. Deducing of animal from the experiment was conducted in 1st and 40th days after intravenous injection of suspensions of nanoparticles. Ultrastructural examination of the liver and lung of rats was performed with a transmission electron microscope. Ultrastructural signs of damage of hepatocytes, pneumocytes and mononuclear phagocytes are not detected.

Keywords: magnitomicelles, iron nanoparticles, surface modification, transmission electron microscopy.

ВВЕДЕНИЕ

Активное развитие нанотехнологий и использование разработанных на их основе наноконструкций в перспективе позволит эффективно решать широкий круг задач в биологии и медицине [1–4]. Наиболее актуальными направлениями исследований в области наномедицины являются адресная доставка лекарственных агентов, локальная магнитная гипертермия, а также создание контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии [5, 6]. Наночастицы, обладающие магнитными свойствами, являются многообещающей основой для разработки новых терапевтических и диагностических средств [2, 7]. Однако полученные в последние десятилетия данные свидетельствуют о комплексе отрицательных биологических эффектов, которые вызывают немодифицированные магнитные наночастицы: высокой токсичности, неспецифическом взаимодействии с клетками и низкой стабильности суспен-

зий [2, 8–10]. Одним из путей решения данной проблемы является поверхностная модификация магнитных наночастиц. Поверхностные модификаторы разделяют на неорганические (золото, кремний, углерод) и органические (хитозан, декстран, полиэтиленгликоль) [7]. Наиболее часто для поверхностной модификации магнитных частиц используется биосовместимый полимер полиэтиленгликоль и его производные [11]. Данный подход позволяет повысить седиментационную и агрегативную устойчивость наноразмерных частиц, снизить их токсичность, а также расширить возможности целевой доставки терапевтических средств [1].

С учетом вышесказанного целью исследования было изучение влияния магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа после однократного внутривенного введения их водных суспензий на ультраструктуру печени и легких крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился на 50 беспородных половозрелых крысах-самцах (виварий СибГМУ, Томск) массой 150 ± 30 г, из которых были сформированы 5 групп: 1-я группа (10 крыс) – интактные животные, 2-я группа (10 крыс) – животные с однократным внутривенным введением суспензии покрытых углеродом наночастиц железа в дозе 6 мг(Fe)/кг(массы тела), 3-я группа (10 крыс) – животные с однократным внутривенным введением покрытых углеродом наночастиц железа в дозе 60 мг(Fe)/кг(массы тела), 4-я группа (10 крыс) – животные с однократным внутривенным введением суспензии магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа в дозе 6 мг(Fe)/кг(массы тела), 5-я группа (10 крыс) – животные с однократным внутривенным введением магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа в дозе 60 мг(Fe)/кг(массы тела).

Покрытые углеродом наночастицы железа были получены газофазным методом в лаборатории прикладного магнетизма Института физики металлов УО РАН (г. Екатеринбург). Наноматериал представлен частицами размером 10 нм с углеродной оболочкой толщиной около 2 нм, представленной несколькими графеновыми слоями. Навеску наноразмерных частиц (3 г) переносили в 50 мл физиологического раствора с pH 7,4 («Вирион», Россия). Полученную суспензию подвергали дезинтеграции на ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Германия) и центрифугировали в течение 10 мин (500g, радиус ротора 15 см). Для приготовления магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа в полученную суспензию добавляли DSPE-PEG-2000 (1,2-дистеароил-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] аммониевую соль) (Avanti Polar Lipids, Inc., США), после чего повторно подвергали дезинтеграции и центрифугированию.

Ультраструктурное исследование печени и легких крыс проводили с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100 CX II (JEOL, Япония). Выведение животных из эксперимента проводили методом асфиксии углекислым газом через 1 и 40 суток после внутривенного введения суспензий. Для первичной фиксации (24 ч, 4 °C) фрагментов печени и легких крыс использовали 4% параформальдегид (SERVA Electrophoresis, Германия) на буфере Хэнкса («Вектор», Россия), для вторичной (2 ч, 4 °C) – 1% OsO₄ (SPI-CHEM, США) на том же буфере. Далее материал подвергали дегидратации в этиловом спирте и ацетоне, после чего заливали в смесь эпоксидных смол Epon 812, Araldit и DDSA (SERVA Electrophoresis, Германия) в соотношении 2:1:4,5 соответственно. Ультратонкие (~80 нм) срезы получали с помощью ультратома Leica EM UC 7 (Leica, Австрия) и помещали на медные сетки. Контрастирование срезов осуществляли уранилацетатом и цитратом свинца («Сигма-Алдрич Рус», Россия). Для обработки количественных данных использовалась

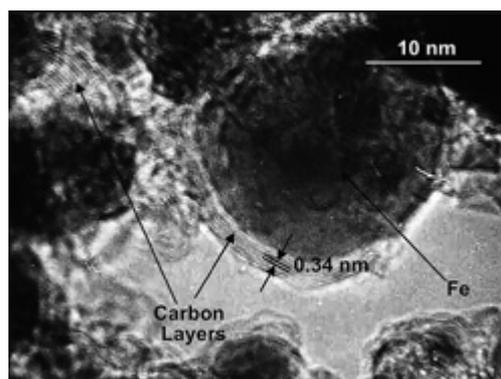


Рисунок 1. Покрытые углеродом наночастицы железа (по данным лаборатории прикладного магнетизма ИФМ УО РАН)

программа SPSS 14.0 (SPSS Inc., США). Результаты исследования представлены в виде средней и стандартного отклонения ($\bar{X} \pm s$). Для выяснения достоверности различий средних значений морфометрических между экспериментальными группами использовали t-тест для независимых выборок (тест Стьюдента) и тест Фридмана для зависимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В печени крыс интактной группы (1-я группа) были выявлены типичные для этого органа популяции клеток (гепатоциты, звездчатые макрофаги, эндотелиоциты). Все перечисленные клетки имели характерную морфологию и локализацию. На 1-е сутки в печени животных 2-й, 3-й, 4-й и 5-й групп были обнаружены клетки, в цитоплазме которых выявляли: везикулы крупные (до 2 мкм) с преимущественно субплазмолеммальным расположением, гранулярный материал в них располагался на периферии, и везикулы небольшого размера (0,5–1 мкм), лежащие в глубоких слоях цитоплазмы, с зернистым материалом, диффузно распределенным в полости органеллы. Обнаруженный материал высокой электронной плотности в везикулах был представлен гранулами, которые образовывали агломераты размером до 100 нм. Повышение дозы введенного наноматериала (3-я и 5-я группы) приводило к увеличению количества как везикул, так и электронно-плотного материала в их полости (рисунок 2). Следует отметить, что количество везикул с содержимым высокой электронной плотности в 3-й группе превосходило таковое в 5-й группе (таблица 1). Признаков повреждения гепатоцитов, а также наличия гранулярного материала высокой электронной плотности в их цитоплазме обнаружено не было. В просвете синусоидов данный материал не фиксировался.

На 40-е сутки в печени крыс 2-й и 3-й групп также были выявлены звездчатые макрофаги, содержащие исключительно небольшие везикулы (0,5-1 мкм) с электронно-плотным материалом, диффузно распределенным в полости органелл (рисунок 3). У животных 4-й и 5-й групп были выявлены как небольшие, так и крупные везикулы (до 2 мкм) с периферичес-

ким расположением электронно-плотного материала. У животных всех групп с внутривенным введением наноматериала количество везикул, содержащих гранулярный электронно-плотный материал, как и количество самого материала в их полости, относительно предыдущего срока эксперимента было снижено (таблица 1). Признаков повреждения гепатоцитов и наличия материала высокой электронной плотности не выявлено. В просвете синусоидов зернистого материала обнаружено не было.

Таблица 1.

Динамика количества везикул, содержащих электронно-плотный материал, в макрофагах печени крыс после внутривенного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе

Группа	Тип везикул	Количество везикул на 1 клетку	
		1-е сутки	40-е сутки
2 группа	Крупные	6,6±1,14#	0,4±0,54#*
	Мелкие	2±0,7#	2,2±0,83#
	Общее количество	8,6±1,14	2,6±0,54*
3 группа	Крупные	12,2±1,48#	0,4±0,54#*
	Мелкие	5,2±1,3#	3,4±0,89#
	Общее количество	17,4±1,81	3,8±0,83*
4 группа	Крупные	4,2±0,83#	1,2±0,44*
	Мелкие	0,8±0,44#	0,6±0,44
	Общее количество	5±1,22	1,8±0,89*
5 группа	Крупные	6,6±0,89#§	2,4±0,89*§
	Мелкие	1,8±0,83#§	2,6±0,54
	Общее количество	8,4±0,55§	5±0,7*

Примечание: # – отличие количества везикул разного типа внутри группы в соответствующие сроки ($p < 0,05$);

* – отличие показателя от его значения на 1-е сутки в той же группе ($p < 0,05$);

§ – отличие показателя от соответствующего ему у крыс с введением покрытых углеродом наночастиц железа при одинаковой дозировке ($p < 0,05$).

В легких крыс 2-й, 3-й, 4-й и 5-й групп были обнаружены клетки системы мононуклеарных фагоцитов, в цитоплазме которых были выявлены крупные (до 2 мкм), лежащие преимущественно субплазмолемально и мелкие (0,5–1 мкм), с околядерным расположением везикулы, содержащие зернистый материал высокой электронной плотности (рисунок 4). Следует отметить, что на 1-е сутки исследования количество крупных везикул доминировало во всех экспериментальных группах, кроме 4-й группы. Распределение содержимого высокой электронной плотности в полости органелл соответствовало описанному ранее в фагоцитах печени. Электронно-плотный материал был

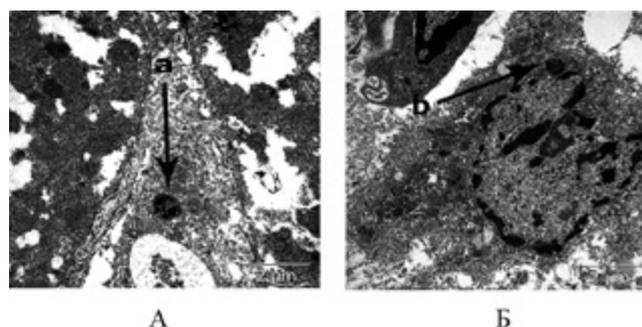


Рисунок 2. Печень крысы через 1 сутки после внутривенного введения покрытых углеродом наночастиц железа в дозе 60 мг(Fe)/кг(массы тела), 3-я группа (А), и магнитомицелл на их основе в дозе 60 мг(Fe)/кг(массы тела), 5-я группа (Б). Фрагмент печеночной дольки с мононуклеарным фагоцитом, содержащим везикулу (а, b) небольшого размера с гранулами материала высокой электронной плотности

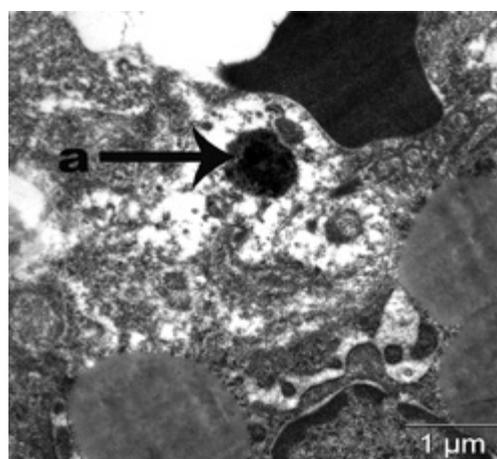


Рисунок 3. Печень крысы через 40 суток после внутривенного введения покрытых углеродом наночастиц железа в дозе 6 мг(Fe)/кг(массы тела), 2-я группа. Фрагмент цитоплазмы звездчатого макрофага с везикулой (а) небольшого размера, содержащей гранулы материала высокой электронной плотности

представлен агрегатами размером до 100 нм. Обращает на себя внимание, что у крыс 3-й и 5-й групп количество везикул, как и количество электронно-плотного содержимого, превосходило таковое у животных 2-й и 4-й групп соответственно. Внутривенное введение магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа (4-я и 5-я группы) приводило к снижению количества крупных везикул на 1-е сутки исследования по сравнению с введением немодифицированных, покрытых углеродом наночастиц железа (2-я и 3-я группы) (таблица 2). Признаков повреждения аэрогематического барьера не выявляли. Пневмоциты были свободны от электронно-плотного материала и не имели признаков повреждения. Присутствия электронно-плотного материала в просвете бронхов и альвеол также не выявляли.

К 40-м суткам исследования во всех группах животных с внутривенным введением наноматериала отмечали снижение количества везикул с содержимым

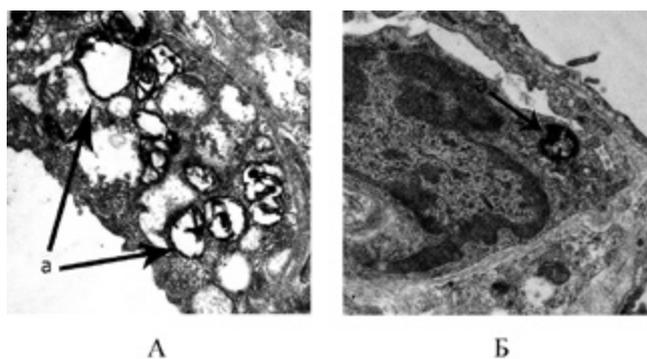


Рисунок 4. Легкое крысы через 1 сутки после внутривенного введения покрытых углеродом наночастиц железа в дозе 60 мг(Fe)/кг(массы тела), 3-я группа (А), и магнитомицелл на их основе в дозе 60 мг(Fe)/кг(массы тела), 5-я группа (Б). Фрагмент цитоплазмы интерстициального макрофага с крупными везикулами (а), содержащими гранулы материала высокой электронной плотности

высокой электронной плотности. У животных 4-й и 5-й групп крупные (до 2 мкм) и мелкие (0,5–1 мкм) везикулы встречались в равных количествах, в то время как у животных 2-й и 3-й групп крупные везикулы не выявлялись вовсе (рисунок 5, таблица 2). Как и в предыдущий срок исследования, не было обнаружено наличия гранулярного электронно-плотного материала в просвете сосудов, альвеол, бронхиол и бронхов. Признаков повреждения аэрогематического барьера, пневмоцитов и клеток системы мононуклеарных фагоцитов обнаружено не было.

Выявленный электронно-плотный материал по своей морфологии (размер, форма, электронная плотность) соответствует покрытым углеродом наночастицам железа. Клетки, в цитоплазме которых выявлены везикулы, в полости которых было выявлено содержимое высокой электронной плотности, по своей структуре и локализации соответствуют клеткам системы мононуклеарных фагоцитов печени (звездчатые макрофаги, клетки Купфера) и легких (альвеолярные и интерстициальные макрофаги) [13]. Крупные везикулы,

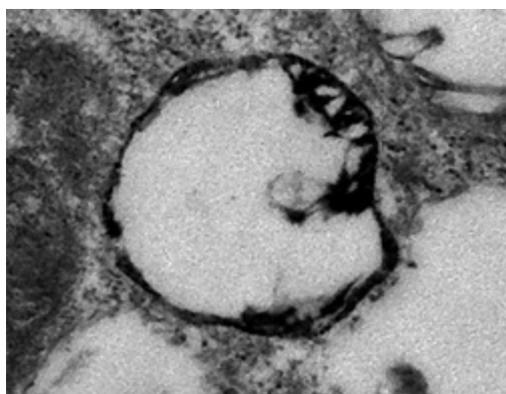


Рисунок 5. Легкое крысы через 40 суток после внутривенного введения покрытых углеродом наночастиц железа в дозе 6 мг(Fe)/кг(массы тела), 2-я группа. Фрагмент цитоплазмы альвеолярного макрофага с крупной везикулой, содержащей материал высокой электронной плотности

электронно-плотный материал в которых располагался по периферии органеллы, по-видимому, являются фагосомами. Везикулы меньшего размера, лежащие в глубоких отделах цитоплазмы, с диффузным расположением электронно-плотного материала в них – лизосомы. Совокупность этих данных может указывать на то, что захват введенного внутривенно наноматериала осуществляется путем фагоцитоза. Отсутствие наноматериала в просвете синусоидов, альвеол, а также бронхов может указывать на достаточно быстрый его фагоцитоз мононуклеарными фагоцитами изученных органов. Обращает на себя внимание соотношение числа фагосом и везикул на 1-е и 40-е сутки исследования. Так, на 1-е сутки в цитоплазме мононуклеарных фагоцитов печени и легких преобладали фагосомы, в то время как на 40-е сутки – лизосомы. Полученные данные могут указывать на то, что процессы захвата и накопления наноматериала происходят наиболее активно в первые сутки после внутривенного введения его суспензии. Наличие фагосом в клетках Купфера печени, а также альвеолярных и интерстициальных макрофагов легких крыс 4-й и 5-й групп в поздние сроки указывает на продолжающиеся процессы захвата наноматериала из циркуляции.

Таблица 2.

Динамика количества везикул, содержащих электронно-плотный материал, в макрофагах легких крыс после внутривенного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе

Группа	Тип везикул	Количество везикул на 1 клетку	
		1-е сутки	40-е сутки
2 группа	Крупные	5,2±0,83#	0#*
	Мелкие	0,4±0,55#	1,4±0,55#
	Общее количество	5,6±0,54	1,4±0,55*
3 группа	Крупные	10,4±1,14#	0#*
	Мелкие	0,4±0,55#	2±0,7#*
	Общее количество	10,8±1,5	2±0,7*
4 группа	Крупные	2,8±0,83\$	1,4±0,55\$
	Мелкие	1,2±0,45	2±0,7
	Общее количество	4±0,7	3,4±0,89\$
5 группа	Крупные	7±0,7#§	1,6±0,83*§
	Мелкие	0,8±0,83#	1,8±0,84
	Общее количество	7,8±1,3	3,4±1,3*

Примечание: # – отличие количества везикул разного типа внутри группы в соответствующие сроки (p<0,05);

* – отличие показателя от его значения на 1 сутки в той же группе (p<0,05);

§ – отличие показателя от соответствующего ему у крыс с введением покрытых углеродом наночастиц железа при одинаковой дозировке (p<0,05).

Отсутствие наноматериала в гепатоцитах и пневмоцитах свидетельствует о достаточно низкой степени их вовлеченности в процессы фармакокинетики покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе. Отсутствие признаков повреждения гепатоцитов, пневмоцитов, а также аэро-гематического барьера может быть обусловлено как низкой токсичностью изучаемого наноматериала, так и быстрым захватом большей его части из системной циркуляции мононуклеарными фагоцитами.

Более продолжительные процессы захвата наноматериала у крыс 4-й и 5-й экспериментальной группы можно объяснить наличием молекул ПЭГ во внешнем слое магнитомицеллы. Модификация наночастиц ПЭГ повышает их гидрофильность и нивелирует опсонизацию наноматериала биомолекулами, в результате чего магнитомицеллы меньше подвержены захвату и накоплению мононуклеарными фагоцитами и способны дольше находиться в циркуляции [1]. Снижение к 40-м суткам исследования количества клеток, содержащих электроно-плотный материал, может указывать на наличие механизмов его элиминации и/или метаболизирования. В статьях [3, 9] авторы выявляли скопления клеток, содержащих наночастицы, в области печеночных триад крыс, а также их присутствие в просветах альвеол и бронхов. Возможно, процессы эвакуации наноматериала в печени осуществляются путем миграции клеток Купфера, накопивших наноматериал, в просвет желчных протоков с последующим выведением в ЖКТ, а в легких – путем миграции макрофагов в просвет альвеол, бронхиол и бронхов с последующим выведением из легких путем мукоцилиарного транспорта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Однократное внутривенное введение магнитомицелл на основе покрытых углеродом наноразмерных частиц железа сопровождается их накоплением в органеллах аппарата внутриклеточного переваривания фагоцитов печени и легких. Трансмиссионная электронная микроскопия изученных органов крыс после внутривенного введения магнитомицелл показала отсутствие ультраструктурных повреждений гепатоцитов, пневмоцитов и мононуклеарных фагоцитов органа, а также аэрогематического барьера, что может указывать на достаточно низкую токсичность введенных наноструктур.

ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Электронная и оптическая микроскопия», ФГБНУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины» СО РАМН, г. Новосибирск, и ЦКП «Нанотех», Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г.Ю. Васюков, И.В. Митрофанова, В.В. Иванова, В.Д. Прокопьева. Поверхностно модифицированные магнитные наночастицы для медико-биологического применения // Бюллетень сибирской медицины. 2014. № 13(6). С. 33–40.
2. Г.Ю. Васюков, И.В. Мильто, И.В. Суходоло, И.В. Митрофанова. Влияние магнитомицелл на основе наночастиц железа, покрытых углеродом, на структуру печени крыс // Бюллетень сибирской медицины. 2015. № 14(2). С. 5–11.
3. С.П. Губин, Ю.А. Кокшаров, Г.Б. Хомутов, Г.Ю. Юрков. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства // Успехи химии. 2005. № 74(6). С. 539–574.
4. С.А. Антипов. Противоопухолевые эффекты *in vitro* и *in vivo* липидных композитов цисплатина и наночастиц ферромагнетика в углеродной оболочке // Бюллетень сибирской медицины. 2010. № 1. С. 9–17.
5. V.N. Nikiforov, E.Yu. Filinova. Biomedical applications of the magnetic nanoparticles // Wiley. 2009. № 8. P. 393–454.
6. A.A. Kuznetsov, O.A. Shlyakhtin, N.A. Brusnetov, O.A. Kuznetsov. «Smart» mediators for self-controlled inductive heating // Eur. Cells Mater. 2002. № 3(2). P. 75–77.
7. M. Dan, D. Scott, P. Hardy, R. Wydra, J. Hilt, R. Yokel, Y. Bae. Block copolymer cross-linked nanoassemblies improve particle stability and biocompatibility of superparamagnetic iron oxide nanoparticles // Pharm Res. 2013. № 30(2). P. 552–561.
8. C. Berry, A. Curtis. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine // J. Phys. D: Appl. Phys. 2003. № 36(13). P. 30–38.
9. L. Shen, P. Laibinis, T. Hatton. Bilayer surfactant stabilized magnetic fluids: synthesis and interactions at interfaces // Langmuir. 1999. № 15(2). P. 447–453.
10. P. Borm, D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson. The potential risks of nanomaterials // Particle and fibre toxicology. 2006. № 3. P. 1–36.
11. H. Gleiter. Nanocrystalline Materials // Adv. Struct. and Func. Mat. 1991. V. 4. P. 1–37.
12. T.M. Fahmy, P.M. Fong, J. Park, T. Constable, W.M. Saltzman. Nanosystems for simultaneous imaging and drug delivery to T cells // AAPS J. 2007. № 9(4). P. E171–E180.
13. И.В. Мильто, И.В. Суходоло. Структура печени, легкого, почек, сердца и селезенки крыс после многократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита // Вестник РАМН. 2012. № 3. С. 75–79.