

УЛЬТРАСТРУКТУРА ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ МНОГОКРАТНОГО ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНОГО МАГНЕТИТА

И. В. Мильто, И. В. Суходоло, А. А. Миллер

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Методом трансмиссионной электронной микроскопии исследована печень крыс после многократного внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита ($2 \text{ г}(\text{Fe}_3\text{O}_4)/\text{кг}_{\text{массы тела}}$). Повреждающего эффекта магнетита на основные клеточные популяции печени в данной дозе не обнаружено. Показано накопление частиц магнетита, главным образом, в фагосомах клеток Купфера. Одиночные частицы магнетита визуализируются в цитоплазме гепатоцитов.

Ключевые слова: наноразмерные частицы магнетита, гепатоцит, клетка Купфера (звездчатый макрофаг).

THE ULTRASTRUCTURE OF RAT LIVER AFTER REPEATED INTRAVENOUS ADMINISTRATION OF NANOPARTICLES OF MAGNETITE

I. V. Milto, I. V. Suhodolo, A. A. Miller

The liver of rats after repeated intravenous application of nanomagnetite suspension ($2 \text{ g}(\text{Fe}_3\text{O}_4)/\text{kg}$ of body weight) was investigated by a method of transmission electronic microscopy. No damaging effect of magnetite on the main cellular populations of liver in the given dose was revealed. Accumulation of particles of magnetite into phagosomes of Kupfer cells is shown. Single particles of magnetite are visualized in cytoplasm hepatocytes.

Key words: nanoparticles of magnetite, hepatocyte, Kupfer cell (stellate macrophage).

Внедрение наноматериалов с магнитными свойствами в медицину открывает перспективы для создания магнитоуправляемых систем целевой доставки лекарственных препаратов [1, 2, 5, 6]. Разработка подобных технологий предваряется детальными исследованиями взаимодействия наноматериала с организмом и жизненно важными органами, среди которых основная роль отводится печени [4].

В литературе недостаточно данных об ультраструктурных изменениях печени при внутривенном введении в организм наноматериалов [4, 7]. Не известны последствия многократного воздействия наноматериалов на жизненно важные органы, особенно в отдаленные сроки (более 20 дней).

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Установление ультраструктурных особенностей ведущих клеточных популяций печени крыс в отдаленные сроки (40 суток) после многократного (20 инъекций) внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Суспензию немодифицированных наноразмерных частиц магнетита готовили в водно-солевом стабилизирующем растворе, содержащем хлорид натрия, цитрат натрия и динатриевую соль 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфониевой кислоты (ГЭПЭС) [2].

Концентрацию магнетита в суспензии устанавливали по концентрации железа рентгено-флуоресцентным методом. Распределение частиц магнетита по размерам в суспензии определяли методом лазерной дифракции. Форму и структуру частиц в суспензии определяли с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Исследование проводилось на 50 беспородных крысах-самцах, массой (150 ± 30) г, из которых были сформированы 3 группы: 1-я группа (10 крыс) — интактные животные; 2-я группа (20 крыс) — контрольная — однократное введение стабилизирующего раствора — в хвостовую вену вводили 2 мл стабилизирующего раствора; 3-я группа (20 крыс) — многократное введение суспензии магнетита — в хвостовую вену крыс каждые двое суток вводили по 2 мл стабилизированной суспензии магнетита ($0,1 \text{ г}(\text{Fe}_3\text{O}_4)/\text{кг}_{\text{массы тела}}$).

Ультраструктурное исследование печени крыс проводили на 40-е сутки после 20 внутривенных инъекций суспензии наноразмерных частиц.

Фрагменты печени ($V \approx 1 \text{ мм}^3$) фиксировали в 4%-м параформальдегиде на буфере Хэнкса (pH 7,4) в течение 24 ч при 4 °C, затем в 1%-й OsO_4 на том же буфере в течение 3 ч при 4 °C. Обезвоживали и заливали в смесь эпон-аралдит. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали 1%-м раствором толуидинового синего в насыщенном растворе буры. Ультратонкие срезы помещали на сетки, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, после чего просматривали на электронном микроскопе JEM-100 CX II, JEOL (Япония) и фотографировали при увеличении 3600, 7200 и 48000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Частицы магнетита в стабилизирующем растворе имеют преимущественно сферическую форму и представлены как отдельными частицами, так и их агрегатами. Средний размер свободных частиц составляет 10 нм, размер агрегатов не превышает 100 нм.

Магниторезонансная томография крыс на 40-е сутки после многократного (20 инъекций) внутривенного

введения суспензии магнетита выявила значительное накопление суперпарамагнитных частиц в печени, легком и селезенке животных. Гистологическое и гистохимическое исследование этих органов крыс показало наличие частиц магнетита в клетках системы мононуклеарных фагоцитов (МНФ).

Не выявлено каких-либо нарушений в ультраструктуре клеток Купфера (звездчатых макрофагов) и гепатоцитов на 40-е сутки после многократного введения магнетита (20 инъекций). Таким образом, повреждающий эффект наноразмерных частиц на клетки печени при суммарной дозе ($2 \text{ г}(\text{Fe}_3\text{O}_4)/\text{кг}_{\text{массы тела}}$) отсутствует. В гепатоцитах обращает на себя внимание расширение просвета электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), наличие большого числа митохондрий с темным матриксом и, в сравнении с печенью интактных и контрольных крыс, представляется увеличенным количеством липидных включений.

После многократного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита на 40-е сутки ($2 \text{ г}(\text{Fe}_3\text{O}_4)/\text{кг}_{\text{массы тела}}$) в просвете синусоидов выявляются скопления, состоящие из частиц высокой электронной плотности, размером 60—90 нм, сходные по морфологическим признакам с агрегатами частиц магнетита.

Кроме того, аналогичные структуры встречаются и в пространстве Диссе, что, по-видимому, свидетельствует о способности наночастиц магнетита проникать через стенку синусоида и делает возможным их взаимодействие с гепатоцитами.

Присутствие частиц магнетита и их агрегатов в циркуляции можно объяснить их большой суммарной дозой ($2 \text{ г}(\text{Fe}_3\text{O}_4)/\text{кг}_{\text{массы тела}}$) и интенсивностью поступления (каждые 2 суток) в организм, опережающей скоростью поглощения наноматериала фагоцитами и выведения его из организма крысы.

Цитоплазма клеток Купфера заполнена гранулами высокой электронной плотности, размером от 500 нм до 1,5 мкм (рис. 1).

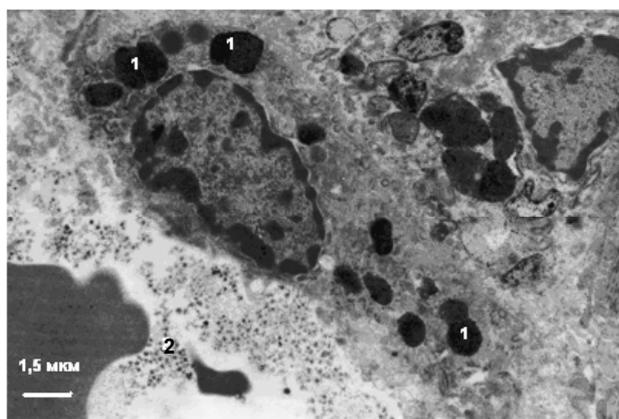


Рис. 1. Печень крысы на 40-е сутки после многократного внутривенного введения суспензии магнетита. Клетка Купфера, содержащая электронноплотные гранулы (1), переполненные магнетитом, в просвете синусоида — наноразмерные частицы магнетита (2). Трансмиссионная электронная микроскопия. Ув. 7200

Гранул содержится не менее 20 на стандартную площадь цитоплазмы, они окружены биологической мембраной и заполнены частицами магнетита, которые лежат в них очень компактно (рис. 2).

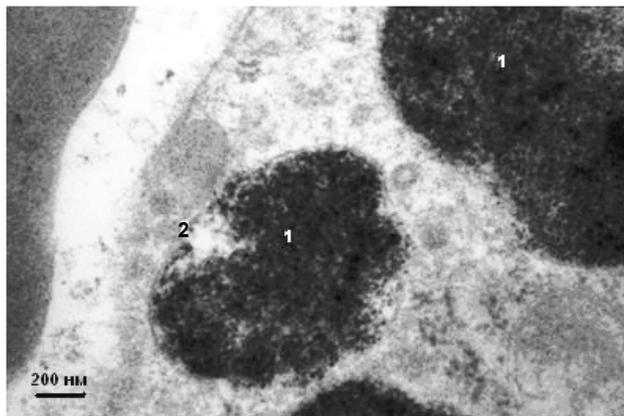


Рис. 2. Печень крысы на 40-е сутки после многократного внутривенного введения суспензии магнетита.

Цитоплазма клетки Купфера: наноразмерные частицы магнетита (1), окруженные биологической мембраной (2). Трансмиссионная электронная микроскопия. Ув. 48000

Свободные частицы в цитоплазме клеток Купфера не выявляются. Наличие у гранул биологической мембраны свидетельствует о проникновении наноразмерных частиц магнетита в клетку механизмом эндоцитоза.

В цитоплазме гепатоцитов повсеместно выявляются отдельные электронноплотные частицы, по виду и размерам аналогичные тем, что расположены в просвете синусоидных капилляров (рис. 3).

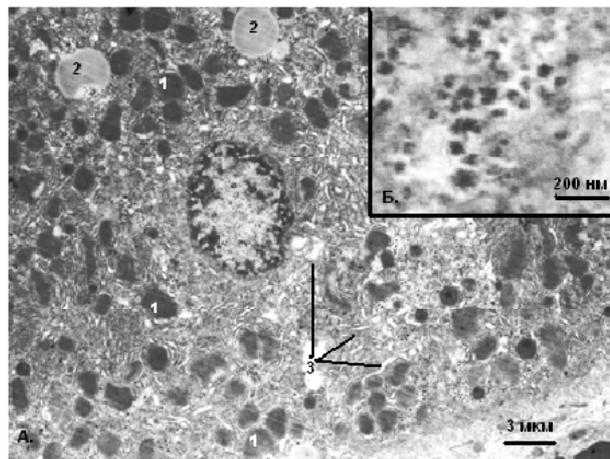


Рис. 3. Печень крысы на 40-е сутки после многократного внутривенного введения суспензии магнетита.

А. — митохондрии с плотным матриксом (1), липидные включения (2), расширение просвета ЭПР (3) в цитоплазме гепатоцита. Б. — участок цитоплазмы гепатоцита с отдельными наноразмерными частицами магнетита. Трансмиссионная электронная микроскопия. А. Ув. 3600. Б. Ув. 96000

Наличие в цитоплазме гепатоцитов структур, сходных по морфологии с теми, что определяются в просвете синусоидов, свидетельствует о проникновении нано-

материала внутрь клетки и об участии гепатоцитов в элиминации наноразмерных частиц. Отсутствие биологической мембраны и довольно мелкие размеры наночастиц говорят о проникновении магнетита в гепатоцит механизмами, отличными от фагоцитоза (прохождение через поры, каналы, использование переносчиков и др.).

Следует отметить, что гистохимическая реакция для выявления железа по методу Перлса в гепатоцитах крыс после многократного внутривенного введения магнетита (на 40 сутки) была отрицательной. Отсутствие гистохимической реакции в цитоплазме гепатоцитов можно объяснить высокой дисперсностью описанных внутриклеточных частиц магнетита, не формирующих агломераты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многократное (20 инъекций) внутривенное введение стабилизированной суспензии немодифицированных наноразмерных частиц магнетита ($0,1 \text{ г}(\text{Fe}_3\text{O}_4)/\text{кг}_{\text{массы тела}}$) к 40-м суткам приводит к их значительному накоплению преимущественно в фагосомах клеток Купфера. В цитоплазме гепатоцитов обнаруживаются свободно лежащие одиночные частицы магнетита. Ультраструктурных изменений исследованных клеток при суммарной дозе магнетита $2 \text{ г}(\text{Fe}_3\text{O}_4)/\text{кг}_{\text{массы тела}}$ нами не описано.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lu A.-H., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2007. — Vol. 46. — P. 1222—1244.
2. Lubbe A. S., Alexiou C., Bergemann C. // *J. Surg. Res.* — 2001. — Vol. 95. — P. 200—206.
3. Martina M. S., et al. // *J. Am. Chem. Soc.* — 2005. — Vol. 127. — P. 10676—10685.
4. Nishimori H., et al. // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* — 2009. — Vol. 72. — P. 496—501.
5. Pankhurst Q. A., et al. // *J. Phys. D: Appl. Phys.* — 2003. — Vol. 36. — P. 167—181.
6. Semmler M., et al. // *Inhal. Toxicol.* — 2004. — Vol. 16. — P. 453—459.
7. Zhang Y., Kohler N., Zhang M. // *Biomaterials.* — 2002. — Vol. 23. — P. 1553—1561.

Контактная информация

Мильто Иван Васильевич — к. б. н., руководитель научно-образовательного центра «Инновационные технологии в морфологии», ГОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России, г. Томск, e-mail: milto_bio@mail.ru

УДК 612.003.004.12:615.234:616.24

ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВА ЖИЗНИ ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ НА ФОНЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

В. А. Лопухова, И. В. Тарасенко

Кафедра клинической фармакологии и интенсивной терапии ВолгГМУ

Представлены результаты сравнительной оценки качества жизни пациентов с бронхиальной астмой и больных хронической обструктивной болезнью легких исходно и через 12 недель комбинированной терапии. Оценка проводилась с помощью русскоязычной версии специального опросника «St. George's Hospital Respiratory Questionnaire» (SGRQ).

Ключевые слова: бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, качество жизни, SGRQ.

STUDY OF LIFE QUALITY IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA AND CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE RECEIVING COMBINATION THERAPY

V. A. Lopukhova, I. V. Tarasenko

Results of a comparative estimation of quality of life in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease initially and after 12 weeks of combination therapy are presented. The estimation was performed using St. George Hospital Respiratory Questionnaire (SGRQ), Russian version.

Key words: bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease, quality of life, SGRQ.

В настоящее время качество жизни (КЖ) рассматривается как критерий оценки эффективности лекарственных препаратов у больных различными хроническими заболеваниями легких [2]. Учитывая высокую распространенность и большое медико-социальное зна-

чение последствий хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и бронхиальной астмы (БА), исследование КЖ людей с этими заболеваниями является крайне актуальным. В работах, посвященных поиску оптимальной стратегии лечения, показатель КЖ используется, в