

## КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ НЕФРОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА ПРИ ИХ ЭНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

© В.А. Липатова<sup>1</sup>, В.М. Ботчей<sup>2</sup>, Л.А. Князева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Для цитирования: Липатова В.А., Ботчей В.М., Князева Л.А. Качественный анализ нефротоксичности наночастиц золота при их энтеральном введении // Педиатр. – 2017. – Т. 8. – № 4. – С. 32–38. doi: 10.17816/PED8432-38

Поступила в редакцию: 30.05.2017

Принята к печати: 02.08.2017

В эксперименте на животных показаны различные эффекты наночастиц золота. Частицы разного размера способны оказывать различные токсические воздействия на ткани, причем большее повреждение часто оказывают наночастицы малых размеров. В данной работе были изучены гистологические и ультраструктурные изменения паренхимы почек, вызванные энтеральным введением наночастиц золота малых размеров (2 нм). В работе использовались различные концентрации коллоидных растворов наночастиц золота размером 2 нм: 10 мкг/мл; 50 мкг/мл; 100 мкг/мл при введении с питьевой водой в течение 7, 14 и 28 суток. Всего в исследовании было 9 групп животных (годовалые нелинейные мыши с массой тела 20–25 г) на разных сроках эксперимента, а также 3 контрольные группы мышей соответственно каждому сроку эксперимента. Гистологические и ультраструктурные изменения были обнаружены в материале всех групп экспериментальных животных по сравнению с контрольными. В целом все альтерации мелкоочаговые, касаются небольшого количества сосудов, отдельных профилей канальцев и единичных клеток. Светооптический анализ общей картины сохранности паренхимы почек показал, что наиболее выраженные изменения отмечаются в корковом веществе органа. Мозговое вещество менее затронуто. В нем выявляются прежде всего дисциркуляторные расстройства, затем изменения эпителия почечных канальцев и, наконец, незначительное вовлечение интерстициальных элементов в ответную реакцию. Канальцы нефронов по сравнению с почечными тельцами претерпевают большие изменения при всех дозах воздействия и во все изучаемые сроки. Признаки дистрофии и некробиоза чаще касаются цитоплазмы клеток и реже их ядер. Свидетельства дисциркуляции выявляются в корковом веществе почки независимо от дозы вводимого препарата уже в ранние сроки эксперимента. Гистологические находки в целом подтверждаются наличием ультраструктурных альтераций, что говорит о первичности повреждения клетки.

**Ключевые слова:** наночастицы золота; нефротоксичность; гистологические и ультраструктурные повреждения.

## QUALITATIVE ANALYSIS OF THE NEPHROTOXICITY OF GOLD NANOPARTICLES IN CASE OF ENTERAL ADMINISTRATION

© V.A. Lipatova<sup>1</sup>, V.M. Botchey<sup>2</sup>, L.A. Knyazeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

For citation: Lipatova VA, Botchey VM, Knyazeva LA. Qualitative analysis of the nephrotoxicity of gold nanoparticles in case of enteral administration. *Pediatrician (St Petersburg)*. 2017;8(4):32-38. doi: 10.17816/PED8432-38

Received: 30.05.2017

Accepted: 02.08.2017

The experiments on animals show the different effects of gold nanoparticles. Gold particles of various sizes may have a variety of toxic effects on the tissues, and more damage is often produced by small nanoparticles. In this work histological and ultrastructural changes of renal parenchyma caused by enteric administration of gold nanoparticles of small sizes (2 nm) were studied used different concentrations of colloidal solutions of gold nanoparticles: 10 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml in drinking water within 7, 14 and 28 days. There were 9 groups of animals (non-linear mice weighing 20-25 g) on different dates of the experiment, as well as 3 control groups of mice, respectively, each term of experiment. Histological and ultrastructural changes were detected in the material of all groups of experimental animals compared with control. In general all small focal alterations relate to a small number of vessels, individual profiles of tubules and single cells. Light microscopy

analysis of the overall picture of integrity of renal parenchyma showed that the most pronounced changes are observed in the cortex of the organ. Medulla is less affected. It identifies, first of all, microvascular disorders, then the renal tubular epithelium changes and finally, a minor involvement of interstitial elements in the response. Tubules of nephrons compared with the renal corpuscles undergo more changes at all dose levels of exposure and in all periods under study. Signs of dystrophy and necrobiosis often relate to the cell cytoplasm and less of their nuclei. Evidence of microvessel disorders detected in the renal cortex is not dependent on the dose of administered nanoparticles already in the early stages of the experiment. Histological findings as a whole are confirmed by the presence of ultrastructure alterations, that points to the primacy of cell damage.

**Keywords:** gold nanoparticles; nephrotoxicity; histological and ultrastructural damage.

## АКТУАЛЬНОСТЬ

В связи с тем что наночастицы золота все больше и больше находят свое применение в практической медицине, встает вопрос о собственно безопасности последних для живого организма [2, 3]. Поэтому в последние годы появилось значительное количество работ, посвященных изучению токсичности наночастиц золота как *in vitro*, так и *in vivo*, преимущественно в эксперименте. Такие работы выполняются на разных уровнях: цитологический и электронно-микроскопический, гистологический и макроскопический, иммунно-гистохимический, масс-спектрометриальный.

*Цель* таких исследований заключается в том, чтобы выяснить:

- 1) какой размер наночастиц наиболее безопасен для введения в живой организм (или частицы какого размера оказывают наименьшее токсическое воздействие);
- 2) концентрации наночастиц золота, пограничные с токсичными;
- 3) оптимальное время экспозиции — т. е. в течение какого времени допустимо применение наночастиц определенного размера, так, чтобы это не привело к токсическим повреждениям;
- 4) какой способ введения наночастиц в организм сопряжен с наименьшими токсическими последствиями;
- 5) какие органы подвержены наибольшему токсическому повреждению и многое др.

Зачастую в таких работах определение условий эксперимента носит эмпирический характер.

Анализ ряда работ по данной тематике показал, что наиболее хорошо изучены наночастицы золота, размер которых больше 10 нм. И совершенно не изучено внутриорганное поведение наночастиц золота размером менее 2 нм, которые стали объектом нашего внимания [4, 7]. Тем более что, по данным ряда работ, при равных условиях (способ введения и время экспозиции) на одни и те же органы наночастицы малых размеров оказывают больший токсический эффект, чем крупные частицы [5, 6].

*Цель:* на морфологическом уровне с помощью ультраструктурного анализа изучить качественные

изменения тканевых компонентов паренхимы почек, вызванные энтеральным введением наночастиц золота малых размеров (2 нм). Установить наличие корреляции между концентрацией наночастиц золота, временем экспозиции, степенью выраженности поражений в органе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основные методы — световая и электронная микроскопия, качественный морфологический анализ биологического материала.

Биологический материал одновременно готовили для световой и электронной микроскопии, как в предыдущем нашем исследовании [1]. Для этого кусочки органов размером не более 1 мм<sup>3</sup> фиксировали в 2,5 % забуференном растворе глутаральдегида и дофиксировали в 1 % растворе четырехоксида осмия. Далее по алгоритму проводилась стандартная электронно-микроскопическая проводка материала, и кусочки тканей заливали в эпоксидную смолу аралдит. После прицельной заточки блоков на ультрамикротоме Reichert-Jungultracut (Германия) получали ультратонкие срезы, монтировали их на медные сеточки и контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца. Изучение ультраструктуры органов, а также фотофиксацию производили на просвечивающем электронном микроскопе HU-12A Hitachi (Япония). Для световой микроскопии на микротоме LKB (Швеция) получали полутонкие срезы, монтировали их на предметные стекла и окрашивали толуидиновым синим. Изучение гистологической картины органов, а также фотофиксацию производили на световом микроскопе Olimpus (Япония).

В эксперименте использовали различные концентрации коллоидных растворов наночастиц золота размером 2 нм. Матричный раствор содержал поверхностно-активное вещество сульфосукцинат натрия в концентрации 24 ммоль (НПК «Наномет»). Всего в исследование включили 9 групп животных (годовалые нелинейные мыши с массой тела 20–25 г) на разных сроках эксперимента, а также 3 контрольные группы мышей соответствен-

Таблица 1

Распределение лабораторных животных по группам исследования

Срок эксперимента в днях	Концентрация коллоидного нанозолота (мкг/мл) для перорального введения			Питьевая вода
	10 мкг/мл	50 мкг/мл	100 мкг/мл	
	Порядковый номер группы			
7 суток	1	2	3	4
14 суток	5	6	7	8
28 суток	9	10	11	12

но каждому сроку эксперимента (табл. 1). Мышам ежедневно вместо питьевой воды вводили перорально водный раствор, содержащий разные концентрации наночастиц золота: 10 мкг/мл; 50 мкг/мл; 100 мкг/мл, средний объем 2,4 мл жидкости в день, что является физиологической нормой. Контроль за общим состоянием животных проводили регулярно (оценивали внешний вид, аппетит, вес, активность, поведенческие реакции). Результат оценивали на 7-е, 14-е и 28-е сутки введения препарата. После декапитации для гистологического и ультрамикроскопического исследования извлекали почки. Материал от контрольных и экспериментальных животных обрабатывался одновременно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Гистологические и ультраструктурные изменения были обнаружены в материале всех групп экспериментальных животных по сравнению с контрольными. В целом все альтерации мелкоочаговые, касаются небольшого количества сосудов, отдельных профилей канальцев и единичных клеток.

*Изменения, выявленные на светооптическом уровне*

Светооптический анализ общей картины сохранности паренхимы почек показал, что более выра-

женные изменения отмечаются в корковом веществе органа. Мозговое вещество менее затронуто. В нем выявляются прежде всего дисциркуляторные расстройства, затем изменения эпителия почечных канальцев и, наконец, незначительное вовлечение интерстициальных элементов в ответную реакцию.

Признаки, характерные для дисциркуляции, такие как расширение капилляров перитубулярной сети, застой крови в них, многочисленные мелкие кровоизлияния, выявляются в корковом веществе почки независимо от дозы вводимого препарата уже в ранние сроки эксперимента — при длительности экспозиции 7 и 14 дней (рис. 1). Вместе с тем на этих сроках крупные очаги геморрагий и тромбоз сосудов встречаются редко.

Капилляры клубочка почечного тельца выглядят одинаково в материале всех экспериментальных групп в любые сроки введения коллоидного золота. Они полнокровны. При высшей дозе воздействия эритроциты в них теряют свои четкие границы и сливаются в одну массу.

Канальцевая система нефронов в разной степени вовлекается в патологический процесс. Так, эпителий наружного листка капсулы Боумена выглядит сохранным при всех воздействиях. Но в ряде случаев наблюдается значительное расширение мочевого пространства капсулы почечного тельца (рис. 2).

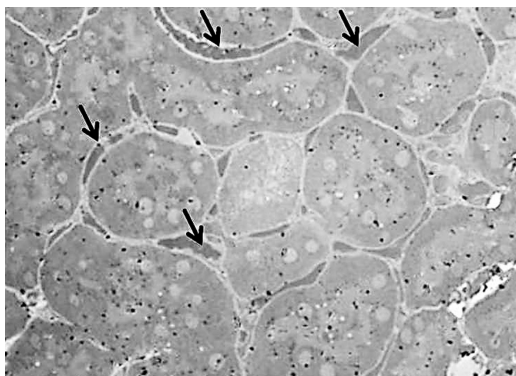


Рис. 1. Почка мыши. Корковое вещество на 7-е сутки эксперимента: после перорального введения наночастиц золота в концентрации 10 мкг/мл. Окраска: толуидиновый синий (ув. ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$ )

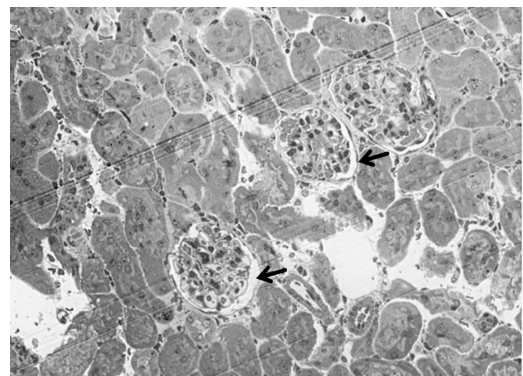


Рис. 2. Почка мыши. Корковое вещество на 7-е сутки эксперимента: после перорального введения наночастиц золота в концентрации 50 мкг/мл. Окраска: толуидиновый синий (ув. ок.  $\times 10$ , об.  $\times 20$ )

При 7-дневном введении прослеживается определенная динамика альтераций в зависимости от концентрации вводимого препарата. В почечных тельцах можно отметить увеличение пространства капсулы — отек (7 дн. 10 мкг/мл), некоторое разрыхление внутренней структуры, то есть появление жидкости в мезангиальном пространстве (7 дн. 100 мкг/мл).

Канальцы нефронов по сравнению с почечными тельцами претерпевают большие изменения при всех дозах воздействия и во все изучаемые сроки. Признаки дистрофии и некролиза чаще касаются цитоплазмы клеток и реже их ядер. Как проксимальные, так и дистальные канальцы вовлекаются в патологический процесс при введении минимальных доз наночастиц золота на самых ранних сроках эксперимента. Клетки проксимальных канальцев накапливают очень мелкие прозрачные вакуоли, их апикальная поверхность теряет микроворсинки (рис. 3). Между клетками и вокруг канальцев появляются светлые нитевидные пространства, заполненные, вероятно, водой. Зернистая дистрофия и вакуолизация части клеток приводит к их гибели (7 дн. 10 мкг/мл).

Увеличение дозы при том же времени воздействия (7 дн. 50 мкг/мл) усугубляет отек межклеточных пространств до явления клеточной диссоциации, увеличивает количество клеток с признаками дистрофии. Дальнейшее возрастание дозы (7 дн. 100 мкг/мл) не приводит к каким-либо значимым нарушениям. Здесь также можно отметить разрушение микроворсинок, уплощение клеток и эпизоды некроза.

Удлинение времени воздействия (28 дн. 50 мкг/мл) не изменило характер патологической реакции, но сделало ее более грубой. Так, в отек вовлекаются интерстициальные пространства, площади клеточной вакуолизации и некроза возрастают.

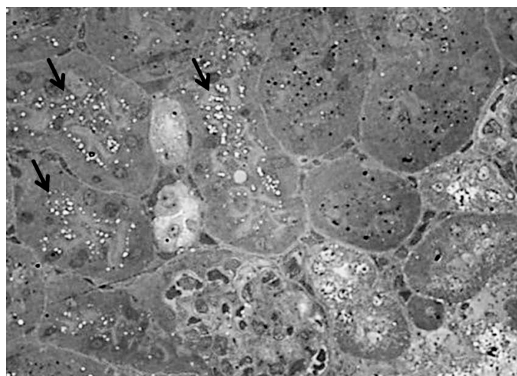


Рис. 3. Почка мыши. Кортикальное вещество на 28-е сутки эксперимента: после перорального введения наночастиц золота в концентрации 50 мкг/мл. Окраска: толуидиновый синий (ув. ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$ )

Структурные нарушения эпителия дистальных канальцев не проявляют никакой динамики, не зависят от дозы и времени воздействия. Они сводятся к диссоциации клеток, уменьшению их высоты, некротической гибели с разрушением стенки канальца. Параллельно с процессом уплощения клеток наблюдаются кариопикноз и появление детрита в просвете канальцев. В целом клетки мезангиума и интерстиция мало вовлечены в патологический ответ.

#### *Изменения, выявленные на электронно-микроскопическом уровне*

Для выявления стойких повреждений клеток при воздействии наночастиц золота был проанализирован материал, полученный после длительного, 28-дневного введения коллоидного золота в различных дозах.

Альтерации артериол состоят в глубокой изрезанности люминальной поверхности эндотелия, расширении канальцево-вакуолярной системы, повреждении внутренней мембраны митохондрий. Эластическая мембрана формирует нерегулярные складки, вероятно, как следствие сильного сокращения ГМК среднего слоя (рис. 4). Канальцево-вакуолярная система и митохондрии ГМК также страдают. Зона межклеточных взаимодействий как эндотелия, так и ГМК содержит совсем небольшое число контактов. Конгломераты электронно-плотных частиц в цитоплазме ГМК напоминают иммунные комплексы.

По мере увеличения сроков эксперимента (до 28 дней) и концентрации вводимых наночастиц золота (до 100 мкг/мл) в органе отмечено сужение просвета артериол и появление в них фрагментов клеток. Цитоплазма эндотелиальных клеток истончается, люминальные поверхности образуют глубокие складки и выросты. Базальные пластинки

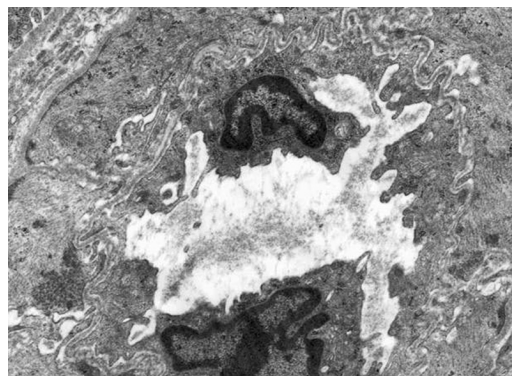


Рис. 4. Почка мыши. Просвет кровеносного сосуда. 28-е сутки эксперимента: после перорального введения наночастиц золота в концентрации 10 мкг/мл (ув.  $\times 2000$ )

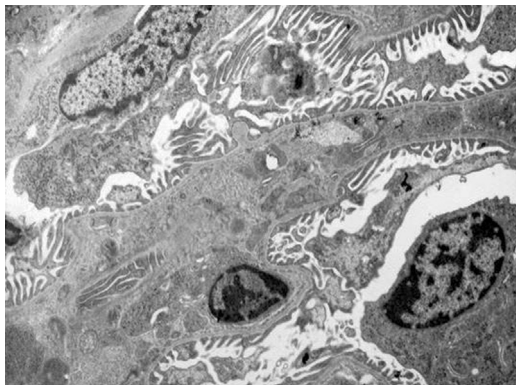


Рис. 5. Почка мыши. Структуры фильтрационного барьера. 28-е сутки эксперимента: после перорального введения наночастиц золота в концентрации 100 мкг/мл (ув.  $\times 2000$ )

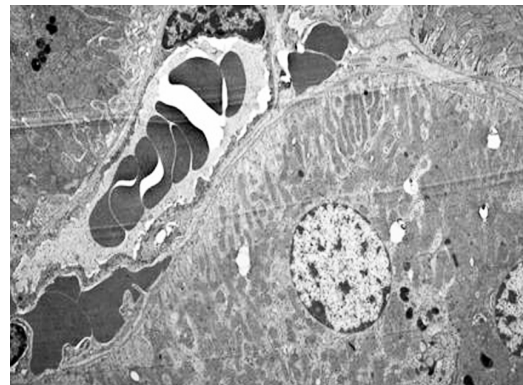


Рис. 6. Почка мыши. Перитубулярная капиллярная сеть. 28-е сутки эксперимента: после перорального введения наночастиц золота в концентрации 50 мкг/мл (ув.  $\times 3000$ )

эндотелия и ГМК часто объединяются электронно-плотными мостиками. ГМК содержат грубые пучки миофиламентов, цитоплазма их светлая, выглядит отечной, канальцево-вакуолярная система расширена, часть митохондрий содержит мелкие вакуоли в матриксе, у других происходит разрушение внутренней мембраны.

Капилляры клубочка выглядят сохранными в материале всех экспериментальных групп животных. Нарушения структурности фильтрационного барьера не выявлено (рис. 5).

Однако подоциты проявляют признаки набухания при условии введения в течение 7 дней 50 мкг/мл и выглядят высокоактивными, с большим количеством отростков в высшей дозе (7 дн. 100 мкг/мл).

В ходе эксперимента наблюдался адаптационный эффект: увеличение времени воздействия до 14 суток при постоянной одинаковой дозе 50 мкг/мл приводило к относительной нормализации структуры.

Альтеративная картина капилляров перитубулярной сети сводится к выявлению измененного эндотелия с поврежденными митохондриями. Сладж эритроцитов, выход форменных элементов в интерстициальное пространство встречаются при воздействии различных доз (рис. 6). Массивное разрушение эндотелия капилляров перитубулярной сети происходит в ответ на воздействие коллоидного золота в высоких дозах (28 дн. 100 мкг/мл).

Эндотелий стенки венул страдает в меньшей степени и выглядит вполне сохранным. Никакой реакции со стороны митохондрий или других органелл отмечено не было.

В клетках внутреннего листка капсулы выявляются незначительные, но зависимые от дозы изменения. Расширение цистерн комплекса Голь-

джи и канальцев ЭПС — постоянные находки. Повреждение внутренней мембраны митохондрий вплоть до вакуолизации органеллы возрастает в зависимости от дозы. В материале животных, получавших 100 мкг/мл, встречаются подоциты со сморщенными ядрами, хроматин которых плотно конденсирован.

Эпителий проксимальных канальцев демонстрирует комплекс ультраструктурных изменений, мало зависимых от дозы: мозаичная деформация микроворсинок, их полное исчезновение; множественные микровезикулы, образующие цепочки вокруг митохондрий и других органелл; большие везикулы, иногда с мембранными фрагментами внутри; расширенные пространства ПКГ и ЭПС. Большинство митохондрий в клетках проксимальных канальцев выглядят сохранными.

Некробиотические изменения ядер эпителиальных клеток дистальных канальцев обнаруживаются при воздействии в дозе 50 мкг/мл. Ядерный хроматин уплотняется, оболочка ядра формирует глубокие складки, а размеры значительно уменьшаются. К патологическим альтерациям следует отнести прежде всего деструкцию митохондрий. Митохондрии выглядят так, как будто испытали разрушительный удар или каким-то образом у них вырван кусок. Таких поврежденных митохондрий в клетке разное количество наряду с совершенно сохранными. Встречаются картины аутофагии. Апикальные части клеток заполнены мелкими везикулами, расширенными цистернами ЭПС, много гипертрофированных ПКГ. Верхушки клеток разрушаются довольно часто. Хотя свидетельства массивной клеточной деструкции встречаются в материале всех экспериментальных групп, доза 100 мкг/мл приводит к повреждениям в ранние сроки эксперимента.

Таблица 2

Сравнительная характеристика выраженности внутриклеточных повреждений

Степень выраженности альтеративных изменений клеточных органелл (в убывающем порядке)	Клеточный элемент паренхимы почки		
	Подоцит	Эпителий проксимальных канальцев	Эпителий дистальных канальцев
Высокая	Митохондрии	Везикулярный компартмент	Митохондрии
Средняя	ЭПС	ЭПС	Везикулярный компартмент
	Комплекс Гольджи	Комплекс Гольджи	ЭПС
Низкая	Ядро	Митохондрии	Комплекс Гольджи
		Лизосомы	Ядро

Анализируя вовлеченность органелл в патологический ответ, можно составить ряд по мере убывания частоты обнаружения альтераций (табл. 2).

### ВЫВОДЫ

1. Оказанное воздействие вызывает патологические изменения на тканевом и субклеточном уровне, т. е. является цитотоксичным.
2. Гистологические находки в целом подтверждают наличием ультраструктурных альтераций, что говорит о первичности повреждения клетки.
3. В патологический ответ вовлекаются ткани с высокой функциональной нагрузкой, занимающие пограничное положение (эндотелий, эпителий).
4. Набор органелл, вовлеченных в патологический ответ, одинаков для всех измененных клеток.
5. В большей степени процессы деструкции затрагивают митохондрии и везикулярный компартмент.
6. Степень альтеративных изменений носит дозозависимый характер.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Липатова В.А., Ботчей В.М., Писцова Т.В., и др. Ультраструктурные признаки кардиотоксичности наночастиц золота в эксперименте *in vivo* // Вестник РГМУ. – 2013. – № 3. – С. 59–63. [Lipatova VA, Botchey VM, Pistsova TV, et al. Ultrastructural evidence

of gold nanoparticles cardiotoxicity in experiments *in vivo*. *Vestnik RGMU*. 2013;(3):59-63. (In Russ.)]

2. Asharani PV, Lianwu Y, Gong Z, Valiyaveetil S. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. *Nanotoxicology*. 2011;(5):43-54. doi: 10.3109/17435390.2010.489207.
3. Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res*. 2010;12(7):2313-2333. doi: 10.1007/s11051-010-9911-8.
4. Helfrich A, Briichert W, Bettmer J. Size characterisation of Au nanoparticles by ICP-MS coupling techniques. *J Anal Atom Spectrom*. 2006;21:431-4. doi: 10.1039/b511705d.
5. Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;19(393):649-655. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.046.
6. Mohamed Anvar K Abdel Halim. The influence of size and exposure duration of gold nanoparticles levels in several rat organs *in vivo*. *Journal of Cell Science and Therapy*. 2012;3.
7. Pan Y, Neuss S, Leifert A, et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*. 2007;3(11):1941-9. doi: 10.1002/sml.200700378.

#### ◆ Информация об авторах

Вероника Анатольевна Липатова – канд. мед. наук, кафедра морфологии. ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва. E-mail: veronika-lipatova@yandex.ru.

#### ◆ Information about the authors

Veronika A. Lipatova – MD, PhD, Associate Professor, Department of Morphology. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: veronika-lipatova@yandex.ru.

## ◆ Информация об авторах

*Вероника Микаэловна Ботчей* – канд. мед. наук, доцент, старший преподаватель, кафедра гистологии, цитологии, эмбриологии медицинского факультета. ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва. E-mail: bonik-do@yandex.ru.

*Людмила Алексеевна Князева* – канд. мед. наук, доцент, кафедра гистологии, цитологии, эмбриологии. ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва. E-mail: lu-kn@yandex.ru.

## ◆ Information about the authors

*Veronika M. Botchey* – MD, PhD, Senior teacher, Department of Histology, Cytology, Embryology, Medical Faculty. Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia. E-mail: bonik-do@yandex.ru.

*Lyudmila A. Knyazeva* – MD, PhD, Associate Professor, Department of Histology, Cytology, Embryology. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia. E-mail: lu-kn@yandex.ru.