

# Гистоэнзимологическое исследование клеток паренхимы печени и почек крыс после внутривенного введения наноразмерного магнетита

*Мильто И.В., Суходоло И.В., Климентьева Т.К., Шевцова Н.М.*

## Histochemical research of cells functionally leading tissue liver and kidneys of rats after intravenous application of nanoparticles magnetite

*Milto I.V., Sukhodolo I.V., Klimentiyeva T.K., Shevtsova N.M.*

*Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск*

© Мильто И.В., Суходоло И.В., Климентьева Т.К., Шевцова Н.М.

Методом магнитно-резонансной томографии показано распределение наноразмерных частиц магнетита в организме крысы после их однократного и многократного внутривенного введения. Отмечено накопление частиц в печени и селезенке животных. Гистоэнзимологическим методом изучена внутриклеточная активность ряда ключевых ферментов гепатоцитов и нефроцитов крыс в различные сроки после внутривенного введения наноразмерного магнетита. Установлено, что внутривенное введение магнетита сопровождается изменением энергетического и пластического метаболизма изучаемых клеток.

**Ключевые слова:** внутриклеточная активность ферментов, наноразмерные частицы магнетита, внутривенное введение.

After unitary and repeated intravenous application magnetite is shown their distribution in organism of a rat by method of magnetic resonance imaging. Accumulation of particles in a liver and a spleen of animals is shown. We studied intracellular activity main enzymes of hepatocyte and nephrocyte rats in various periods after intravenous application of nanoparticles magnetite by histochemical method. Intravenous application of magnetite is accompanied change of energetic and plastic metabolism of studied cells.

**Key words:** intracellular activity enzymes, nanoparticles magnetite, intravenous application.

УДК 611.36:611.611:615.456:549.731.13-022.532]-076.5:599.323.4

### Введение

Развитие технологий, основанных на применении наноразмерных материалов в биологии и медицине, является приоритетным направлением биомедицинских исследований и открывает перспективы для создания новых методов диагностики и лечения заболеваний человека и животных. На сегодняшний день достаточно большое количество работ посвящено изучению различных аспектов взаимодействия наноразмерных материалов с биологическими объектами. Однако большинство исследований биологических свойств наноматериалов проведено *in vitro* [5—7, 10, 11]. В современной литературе отсутствуют какие-либо сведения о влиянии наноразмерных частиц магнетита на внутриклеточную активность ферментов *in vivo*.

Цель работы — выявление изменений метаболического статуса гепатоцитов и нефроцитов проксимальных извитых канальцев крыс после однократного и многократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита.

### Материал и методы

Из наноразмерных частиц магнетита готовили суспензию в водно-солевом стабилизирующем растворе, содержащем хлорид натрия, цитрат натрия и динатриевую соль 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфониевой кислоты (ГЭПЭС) [9].

Концентрацию магнетита в суспензии устанавливали по концентрации железа рентгенофлуоресцентным методом. Распределение частиц магнетита по размерам в суспензии устанавливали методом лазерной дифракции. Форму и структуру частиц в суспен-

зии определяли с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Исследование проводилось на 95 беспородных крысах-самцах массой тела ( $150 \pm 30$ ) г, из которых были сформированы четыре группы: 1-я группа (25 крыс) — интактные животные (In); 2-я группа (25 крыс) — контрольная — животные, которым осуществлялось многократное введение стабилизирующего раствора: в хвостовую вену каждые 2 сут вводили по 2 мл стабилизирующего раствора (SS); 3-я группа (25 крыс) — однократное введение суспензии магнетита: в хвостовую вену было введено 2 мл стандартизированной суспензии магнетита ( $0,1$  г  $Fe_3O_4$  на  $1$  кг массы тела) (NPU); 4-я группа (20 крыс) — многократное введение суспензии магнетита: в хвостовую вену крыс каждые 2 сут вводили по 2 мл стабилизированной суспензии магнетита ( $0,1$  г  $Fe_3O_4$  на  $1$  кг массы тела) (NPR).

Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 755 МЗ СССР от 12.08.1987) и Федерального закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997.

Томографическое исследование внутренних органов крыс проводили на магнитно-резонансно-томографическом (МРТ) сканере Toshiba Vantage (Япония) с индукцией поля  $1,5$  Тл и на МРТ-сканере Magnetom Open (Япония) с индукцией поля  $0,2$  Тл на 1-е и 40-е сут после однократного введения, а также на 40-е сут после многократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита.

Материал для гистоэнзимологического исследования (печень и почки) замораживали в охлажденном жидким азотом петролейном эфире и хранили в морозильной камере Sanyo Ultra low MDF-192 (Япония) при температуре  $-75$  °С. Из замороженных органов в криостате TP-OM-5-01 (Россия) готовились срезы толщиной  $10$  мкм.

Гистоэнзимологическое исследование активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также общей активности НАДН- и НАДФН-зависимых ферментов в гепатоцитах и нефроцитах проксимальных извитых канальцев крыс проводили в соответствии с рекомендациями З. Лойды и соавт. [2] на 1, 7, 14, 21 и 40-е сут после начала эксперимента.

Количественную оценку активности ферментов производили на микроскопе «Люмам-ИЗ» (Россия) в проходящем свете, длина волны  $546$  нм, используя зонд площадью  $0,5$  мкм<sup>2</sup>. Оптическую плотность измеряли не менее чем в 50 клетках препарата и выражали в условных единицах оптической плотности.

Статистическая обработка результатов производилась с помощью статистического пакета программ SPSS 11.5. Результаты представлены в виде среднего арифметического  $\bar{X}$  и ошибки среднего  $m$ . Распределение на соответствие нормальному проверяли с помощью критерия Шапиро—Уилки. Так как распределение соответствовало нормальному, то для выяснения достоверности различий средних значений гистоэнзимологических показателей между экспериментальными группами использовали  $t$ -тест Стьюдента для независимых выборок и  $t$ -тест для зависимых выборок.

## Результаты

Магнитно-резонансные (МР) томограммы интактных и контрольных крыс четкие, позволяют оценить анатомо-топографическое состояние внутренних органов. МРТ-исследование не выявило различий в структуре внутренних органов у животных двух данных групп.

На МР-томограммах крыс после однократного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита отмечается искажение сигнала и ухудшение изображения в области эпигастрия. Наиболее сильно сигнал искажен в области печени и селезенки (рис. 1,а).

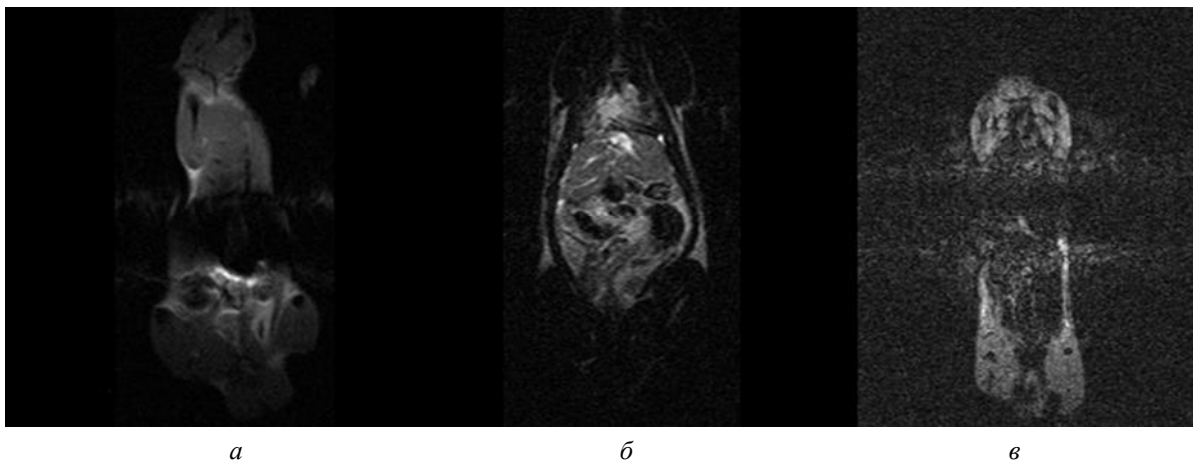


Рис. 1. МРТ крыс после внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита: однократное введение (3-я группа) на 1-е (а) и 40-е сут (б); многократное введение (4-я группа) на 40-е сут эксперимента (в) (суммарная доза 2 г  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела)

К 40-м сут после однократного внутривенного введения суспензии магнетита качество изображения нормализуется (рис. 1,б).

МРТ-исследование крыс на 40-е сут после многократного внутривенного введения суспензии магнетита (суммарная доза 2 г  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела) выявило более существенное искажение МР сигнала (рис. 1,в), чем после однократного внутривенного введения суспензии магнетита.

Внутривенное введение суспензии наноразмерного магнетита сопровождается искажением сигнала в области расположения печени и селезенки крыс. Изображение нормализуется к 40-м сут после однократного внутривенного введения суспензии магнетита и нарушается более существенно к 40-м сут у крыс, многократно получавших внутривенные инъекции суспензии наноразмерных частиц.

Гистологическое исследование органов, которые, по данным МРТ, наиболее интенсивно накапливали частицы магнетита (печень, почки, селезенка), выявило в них незначительные морфологические изменения [3]. Данное обстоятельство послужило поводом для проведения в условиях предпринятого эксперимента гистоэнзимологического исследования с целью диагностики функциональных изменений в клетках жизненно важных органов.

При внутривенном введении раствора-стабилизатора изменений активности ферментов в исследованных органах относительно аналогичных по-

казателей у животных интактной группы не наблюдалось ни в один из экспериментальных сроков.

Во все экспериментальные сроки после однократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита (100 мг  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела) в гепатоцитах крыс активность всех исследованных ферментов не отличалась от таковых у интактных животных.

При многократном введении на 7 (3 инъекции, 300 мг  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела), 14 (6 инъекций, 600 мг  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела), 21 (10 инъекций, 1 г  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела) и 40-е сут (20 инъекций, 2 г  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела) активность СДГ (рис. 2,а), НАДН- и НАДФН-зависимых ферментов в гепатоцитах достоверно ниже аналогичных показателей интактных крыс, причем активность СДГ снижается с увеличением дозы вводимого наноматериала. Активность ЛДГ начиная с 14-х сут повышена и сохраняется таковой до 40 сут (рис. 3,а).

После однократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита (100 мг  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела) активность СДГ в нефроцитах проксимальных извитых канальцев крыс достоверно выше (рис. 2,б), а активность ЛДГ ниже аналогичных значений у интактных животных только на 1-е сут (рис. 3,б). Изменений в активности НАДН- и НАДФН-зависимых ферментов в нефроцитах проксимальных извитых канальцев крыс после однократного введения суспензии магнетита не выявлено.

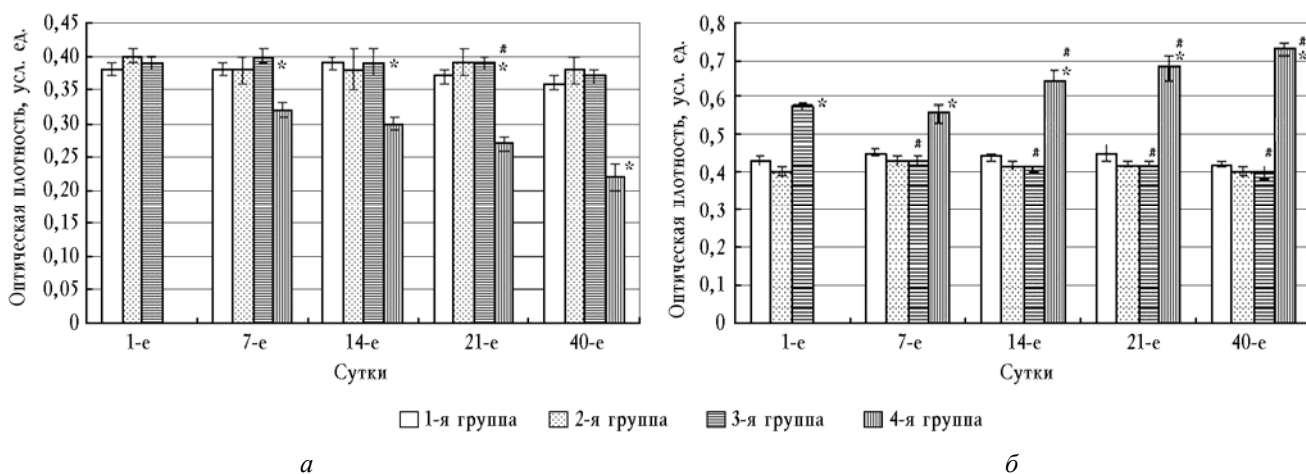


Рис. 2. Динамика внутриклеточной активности СДГ в гепатоцитах (а) и нефроцитах проксимальных извитых канальцев (б) крыс при внутривенном введении магнетита: \* — статистически достоверное отличие параметра от соответствующего показателя животных интактной группы ( $p < 0,05$ ); # — статистически достоверное отличие параметра относительно его величины на 1-е сут для 3-й группы или относительно его величины на 7-е сут для 4-й группы ( $p < 0,05$ )

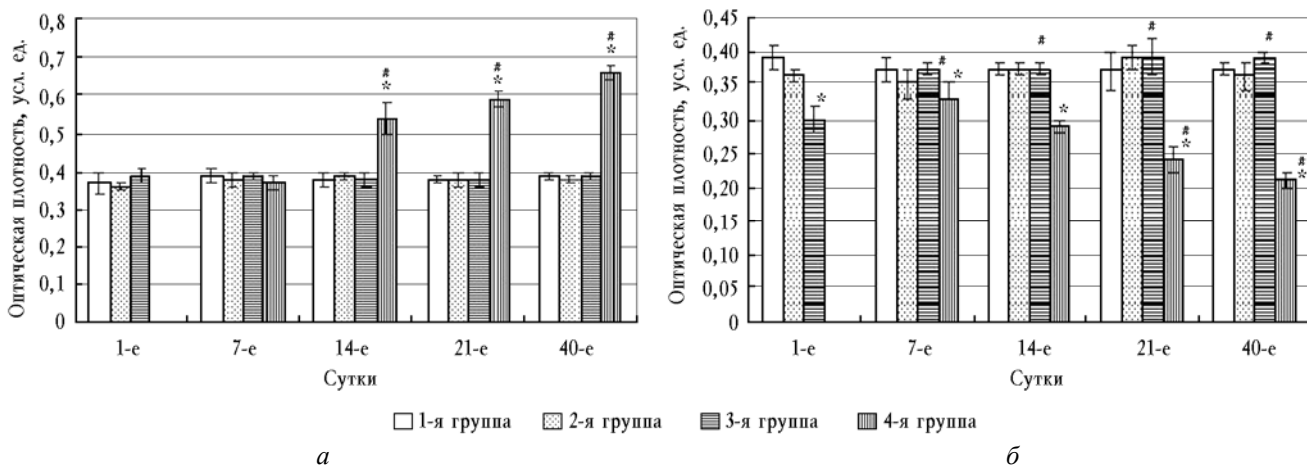


Рис. 3. Динамика внутриклеточной активности ЛДГ в гепатоцитах (а) и нефроцитах проксимальных извитых канальцев (б) крыс при внутривенном введении магнетита: \* — статистически достоверное отличие параметра от соответствующего показателя животных интактной группы ( $p < 0,05$ ); # — статистически достоверное отличие параметра относительно его величины на 1-е сут для 3-й группы или относительно его величины на 7-е сут для 4-й группы ( $p < 0,05$ )

При многократном введении на 7 (3 инъекции, 300 мг  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела), 14 (6 инъекций, 600 мг  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела), 21 (10 инъекций, 1 г  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела) и 40-е сут (20 инъекций, 2 г  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела) активность СДГ в нефроцитах проксимальных извитых канальцев достоверно выше аналогичных показателей интактных крыс (рис. 2, б). Общая активность НАДН- и НАДФН-зависимых ферментов, а также активность ЛДГ (рис. 3, б) в этих нефроцитах достоверно ниже соответствующих показате-

лей у интактных крыс и снижается к 40-м сут с увеличением дозы.

## Обсуждение

МРТ-исследование проводилось для визуализации распределения наноразмерных частиц магнетита в организме крыс после их внутривенного введения с целью выявления органов с наиболее значимым накоплением магнетита для дальнейшего детального изучения.

Искажение МРТ-сигнала связано с особыми физическими свойствами используемого наноразмерного магнетита [4]. Его частицы, являясь суперпарамагнетиками, создают собственное магнитное поле, которое взаимодействует с магнитным полем, приложенным к организму, при МРТ-исследовании и препятствует получению качественного сигнала [9].

Нарушение МРТ-сигнала и ухудшение качества изображения в области эпигастрия после однократного и многократного внутривенного введения магнетита объясняется накоплением наноразмерных частиц магнетита главным образом в печени и селезенке крыс. Кумуляция наноразмерных частиц магнетита именно в этих органах связана с развитой в них системой мононуклеарных фагоцитов [1]. Включение в гистоэнзимологическое исследование клеток паренхимы почек обусловлено их активным участием в элиминации наноразмерных частиц магнетита из организма животного [11].

Нормализация качества МР-томограмм к 40-м сут после однократного внутривенного введения суспензии магнетита объясняется снижением содержания частиц магнетита в печени, что может быть обеспечено только за счет его выведения из организма крыс.

Более существенное искажение МРТ-сигнала на 40-е сут у крыс после многократного внутривенного введения объясняется большей в сравнении с однократным введением суммарной дозой магнетита (2 г  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела), на выведение которой из организма требуется, соответственно, большее время. Наноразмерные частицы магнетита у животных этой группы также кумулируются в печени [10].

Для изучения метаболических изменений в клетках паренхимы внутренних органов крыс после внутривенного введения суспензии магнетита использовали комплекс гистоэнзимологических методов.

Изменения активности ферментов при условии количественной их оценки являются наиболее достоверным показателем для суждения о состоянии клеточного метаболизма. Представление о метаболизме той или иной клетки может быть получено путем исследования ее отдельных метаболонов: цикла трикарбоновых кислот, гликолиза, пентозофосфатного пути, цикла синтеза мочевины и др. [2, 5].

Раствор-стабилизатор, использованный в данной работе, не влияет на активность внутриклеточных ферментов гепатоцитов и эпителиоцитов проксималь-

ных извитых канальцев крыс. Отсутствие повреждающего эффекта объясняется тем, что компоненты раствора-стабилизатора (хлорид натрия, цитрат натрия и ГЭПЭС) являются биосовместимыми соединениями и на протяжении многих лет широко используются в биологических и медицинских исследованиях.

Печень занимает центральное место в фармакокинетике наноразмерных частиц магнетита [10]. Снижение активности СДГ в гепатоцитах крыс после многократного внутривенного введения суспензии магнетита начинается с 7-х сут и прогрессирует к 40-м сут, что свидетельствует о влиянии наноразмерных частиц магнетита на энергетический метаболизм клетки, вызывая его смещение в сторону анаэробных реакций. Это подтверждается сопутствующим увеличением активности ЛДГ в гепатоцитах крыс. Снижение активности пиридинзависимых дегидрогеназ свидетельствует о замедлении энергетического метаболизма и снижении процессов восстановительного синтеза в цитозоле гепатоцитов.

Описанные выше изменения метаболизма гепатоцитов развиваются лишь после многократного введения суспензии магнетита в суммарной дозе не менее 300 мг  $Fe_3O_4$  на 1 кг массы тела, что объясняется достаточно большим компенсаторным резервом этого органа.

После многократного внутривенного введения наноразмерных частиц пониженная активность СДГ и повышенная активность ЛДГ сохраняются на протяжении всего эксперимента, что свидетельствует об истощении биохимических компенсаторных механизмов печени вследствие постоянного увеличения дозы магнетита. Угнетение аэробного пути в гепатоцитах, вызванное снижением эффективности цикла Кребса, сопровождается активацией гликолитических процессов. Подобные изменения активности СДГ и ЛДГ можно объяснить ишемией, развивающейся на фоне эмболии сосудов микроциркуляторного русла печени, вызванной агломератами наноразмерных частиц. Гипоксия, возникающая вследствие ишемии, способствует активации гликолитического пути окисления субстратов в печени.

Кроме того, наноразмерные материалы могут непосредственно влиять на активность внутриклеточных ферментов после проникновения внутрь клетки [8, 12]. Взаимодействуя с ферментами, частицы магнети-

та способны вызывать конформационные изменения в третичной и четвертичной структуре белковых молекул, которые сказываются на активности энзимов. После однократного внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев почки наблюдается лишь кратковременное увеличение активности СДГ, нормализующееся уже к 7-м сут. Возвращение активности СДГ до уровня аналогичных значений интактных крыс, по видимому, совпадает по времени с выведением основного количества магнетита из организма. Кроме того, изменение активности СДГ в почках уже после однократного введения суспензии магнетита свидетельствует об их активном участии в элиминации наночастиц магнетита из организма и объясняется наиболее интенсивным выведением наноматериала в первые 24 ч после инъекции. Частичное выведение магнетита из организма ведет к нормализации параметров активности ферментов энергетического метаболизма.

Повышение активности СДГ и снижение активности ЛДГ и НАДН-зависимых дегидрогеназ в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев почки после многократного внутривенного введения суспензии магнетита, сохраняющиеся в течение всего эксперимента, вероятно, связаны с компенсаторной реакцией этих нефроцитов. На фоне постоянного введения магнетита у животных этой группы активируются процессы фильтрации для обеспечения элиминации наноразмерного материала из циркуляции. Усиление фильтрации неизбежно ведет к активации процессов реабсорбции и секреции, для протекания которых необходима энергия АТФ. Повышенная потребность в АТФ обеспечивается активацией цикла Кребса и угнетением гликолиза с целью более эффективного использования субстратов для синтеза АТФ [5].

Расходование АТФ для обеспечения и интенсификации работы транспортных механизмов ведет к угнетению биосинтетических процессов в цитозоле, что подтверждается прогрессирующим снижением общей активности НАДФН-зависимых ферментов. В целом гистоэнзимологическое исследование продемонстрировало влияние наноматериала на метаболический статус эпителиоцитов почки и подтверждает активное участие последних в фармакокинетике наноразмерных частиц магнетита.

## Заключение

Однократное внутривенное введение суспензии наноразмерного магнетита не оказывает влияния на метаболический статус гепатоцитов крыс, однако вызывает обратимые изменения энергетического метаболизма нефроцитов проксимальных извитых канальцев крыс, проявляющиеся активацией аэробного окисления субстратов.

Многократное внутривенное введение суспензии наноразмерных частиц магнетита сопровождается активацией гликолиза в гепатоцитах; в нефроцитах же крыс происходит активация аэробного пути окисления субстратов. В обоих клеточных типах многократное внутривенное введение магнетита вызывает угнетение НАДФН-зависимых процессов восстановительного синтеза. Обнаруженные изменения внутриклеточного метаболизма при многократном введении суспензии магнетита сохраняются в течение всего эксперимента и носят дозозависимый характер.

## Литература

1. *Karr J.* Макрофаги: обзор ультраструктуры и функции: пер. с англ. М.: Медицина, 1978. 189 с.
2. *Ллойда З., Госсрай Р., Шиблер Т.* Гистохимия ферментов (лабораторные методы): пер. с англ. М.: Мир, 1982. 272 с.
3. *Мильто И.В., Дзюман А.Н.* Структура печени, легкого и почек крыс при внутривенном введении магнитолипосом // Морфология. 2009. № 3. С. 63—66.
4. *Найден Е.П., Журавлёв В.А., Итин В.И.* Структура и магнитные свойства наноразмерных порошков простых ферритов, полученных методом механохимического синтеза // Известия вузов. Физика. 2006. № 9. С. 40—44.
5. *Dixon M., Needham D.M.* Biochemical research on chemical warfare agents // Nature. 1946. V. 158. P. 432—438.
6. *Dobson G.* Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery // Gene Therapy. 2006. V. 13. P. 283—287.
7. *Gu H., Xu K., Xu C. et al.* Biofunctional magnetic nanoparticles for DNA protein separation and pathogen detection // J. of the American chemical society. 2006. V. 14. P. 941—949.
8. *Koneracka M., Kopcansky P., Antalik M. et al.* Immobilization of proteins and enzymes to fine magnetic particles // J. of Magnetism and Magnetic Materials. 1999. V. 201. P. 427—430.
9. *Martina M.S., Fortin J.P., Menager C. et al.* Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 10676—10685.
10. *Nishimori H., Kondoh M., Isoda K. et al.* Silica nanoparticles as hepatotoxicants // Eur. J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2009. V. 72. P. 496—501.
11. *Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K. et al.* Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine // J. Phys. D. Appl. Phys. 2003. V. 36. P. 167—181.
12. *Yang Z.M., Yang Z.M., Xu K.M., Guo Z.F. et al.* Intracellular

*Мильто И.В., Суходоло И.В., Климентьева Т.К., Шевцова Н.М. Гистоэнзимологическое исследование клеток паренхимы...*

enzymatic formation of nanofibers results in hydrogelation  
and regulated cell death // *Advanced Materials*. 2007. V. 17.

P. 3152—3156.

Поступила в редакцию 14.12.2010 г.

Утверждена к печати 01.04.2011 г.

#### **Сведения об авторах**

*И.В. Мильто* — канд. биол. наук, руководитель научно-образовательного центра «Инновационные технологии в морфологии», доцент кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

*И.В. Суходоло* — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

*Т.К. Климентьева* — канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

*Н.М. Шевцова* — д-р мед. наук, ст. научный сотрудник ЦНИЛ, зав. отделом гематологии, иммунологии и морфологии ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск).

#### **Для корреспонденции**

*Мильто Иван Васильевич*, тел.: 8 (382-2) 42-64-43, 8-913-858-4283, e-mail: milto\_bio@mail.ru