

ДИНАМИКА ЭЛИМИНАЦИИ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА У МОРСКИХ СВИНОК ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ ВВЕДЕНИИ

Носарев А.В.¹, Абраменко Е.Е.¹, Капилевич Л.В.^{1,2}, Дьякова Е.Ю.¹, Селиванова В.С.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск

РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты изучения динамики гистологических изменений в тканях органов дыхания морских свинок в процессе элиминации после продолжительного курса ингаляций наночастиц магнетита. В легких экспериментальных животных в результате длительного ингаляционного поступления наномангнетита развивалась воспалительная реакция, накопление Перл-позитивных клеток. Данные изменения не проходили даже спустя месяц после прекращения поступления наночастиц магнетита в организм экспериментальных животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гладкомышечные клетки, наночастицы, сигнальные системы, воспаление.

Введение

Благодаря своим специфическим свойствам наночастицы активно используются в медицине, входят в состав некоторых лекарственных средств, рентгеноконтрастных препаратов [1, 2]. В то же время человек постоянно неосознанно вступает в контакт с огромным количеством наноразмерных частиц, выделяющихся в атмосферу в результате промышленной деятельности [2]. В силу свойств, обусловленных размером частиц, они попадают в организм, преодолевая защитные барьеры, и основным путем проникновения является ингаляционный [3, 4]. В этом случае наиболее вероятными мишенями воздействия наночастиц будут являться воздухоносные пути, легочная паренхима, сосуды малого круга кровообращения. Таким образом, эффект воздействия наночастиц будет отражаться на состоянии функции дыхания, которая уже уязвима в условиях нынешнего уровня загрязнения атмосферного воздуха. Следствием этого могут являться развитие таких хронических заболеваний, как хроническая обструктивная болезнь легких и бронхиальная астма, и прогрессирование имеющихся респираторных нарушений.

Проведенные исследования доказывают, что при длительном воздействии на систему органов дыхания наночастиц последние вызывают воспаление легких

[5, 6]. Повреждение тканей в этом случае обусловлено главным образом активными формами кислорода, которые являются основным фактором цитотоксичности фагоцитов [7].

Меньше внимания в исследованиях уделено вопросам кинетики и элиминации экзогенных нанообъектов различной химической природы в живом организме. При отсутствии надлежащих механизмов выведения наноразмерные частицы способны накапливаться, повреждая ткани [8, 9]. Получение данных о механизмах элиминации наночастиц представляется в настоящее время весьма актуальным.

Цель исследования – изучить динамику морфологических изменений в легких после курсового ингаляционного воздействия наноразмерного магнетита.

Материал и методы

Объектом исследования служили экспериментальные животные – половозрелые морские свинки-самцы. Животных опытной группы в количестве 20 особей подвергали курсовому ингаляторному воздействию аэрозолем взвеси наноразмерных частиц Fe_3O_4 в дистиллированной воде (0,025 мг/мл) с помощью ультразвукового небулайзера с экспозицией 60 мин ежедневно в течение 23 сут и выводили из эксперимента на 9, 15, 21 и 29-е сут после завершения курса ингаляции. В группе контроля были интактные животные (20 особей).

Из прикорневой и периферической частей легких приготавливали гистологические препараты, окрашенные сочетанно гематоксилином и эозином и по методу

✉ Носарев Алексей Валерьевич, тел. 8-923-407-9213; e-mail: avnosarev@yandex.ru

Перлса для выявления трехвалентного железа. На микропрепаратах проводили подсчет количества Перлс-позитивных клеток в 1 мм^2 . Световую микроскопию проводили при 100-, 200-, 400-кратном увеличении [10].

Результаты морфометрического исследования представлены в виде медианы Me и межквартильного интервала Q_1-Q_3 . Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий Колмогорова–Смирнова. Проверка статистических гипотез о принадлежности выборок к одной генеральной совокупности или совокупностям с одинаковыми параметрами проводилась с помощью рангового U -критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Основным критерием оценки элиминации наночастиц Fe_3O_4 в работе принималось количество Перлс-позитивных альвеолярных макрофагов, присутствующих в легких в норме (гемосидерофаги). Так, в легких интактных животных обнаруживались единичные Перлс-позитивные клетки, локализованные в просветах альвеол и в межальвеолярных перегородках. В легких животных опытной группы на 9-е сут после завершения курса ингаляции были обнаружены единичные очаго-

вые скопления Перлс-позитивных клеток, локализующиеся в периферической части органа. На 15-е сут наблюдалась очаговая и диффузная инфильтрация стромы Перлс-позитивными альвеолярными и интерстициальными макрофагами. Спустя 21 сут сохранялись единичные скопления Перлс-позитивных альвеолярных макрофагов на периферии, как и по истечении 9 сут после окончания курса ингаляций. По прошествии 29 сут Перлс-позитивные клетки обнаруживались диффузно, а также в виде небольших субплевральных скоплений.

Показано достоверное увеличение числа Перлс-позитивных макрофагов на всех сроках исследования ($p < 0,05$), за исключением 21-х сут после окончания курса ингаляций (таблица). В этот период их количество уменьшается, приближаясь к значениям в контрольной группе. На 29-е сут регистрируется увеличение их количества. По-видимому, здесь имеет место протекание нескольких процессов. Часть альвеолярных макрофагов, фагоцитировавшая поступившие ингаляционно наночастицы, мигрирует в лимфатическую систему легких и плевры, снижая количество макрофагов на единицу площади среза. Увеличение их числа, вероятно, обусловлено тем, что влияние частиц наномagnesита *in vivo* приводит к стимуляции пролиферации макрофагов.

Количественная оценка нахождения Перлс-позитивных клеток в легких экспериментальных животных в прикорневой зоне на разных сроках после окончания курса ингаляций

Показатель	Контрольная группа	Опытная группа			
		9-е сут	15-е сут	21-е сут	29-е сут
Количество Перлс-позитивных клеток на 1 мм^2 среза	3,77 (3,76–3,8)	4,8 (3,3–7,2)	6,1 (2,8–7,2)	4,2 (3,5–5,3)	5,2 (3,5–6,5)

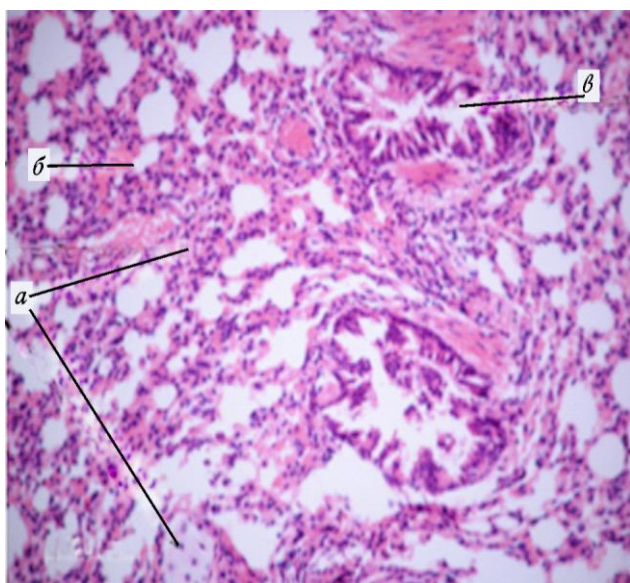


Рис. 1. Легкое интактной морской свинки (контрольная группа). Окраска гематоксилином и эозином и по методу Перлса: *a* – единичные Перлс-позитивные клетки; *b* – полнокровие микроциркуляторного русла; *в* – уменьшение просвета бронха мелкого

калибра. Ув. 200

Также на начальном этапе (на 9–15-е сут после окончания курса ингаляции) в мелких бронхах обнаруживаются признаки острой воспалительной реакции: гиперемия сосудов, отек подслизистой оболочки, экссудат в просвете бронхов, которые сохраняются в дальнейшем в течение всего периода наблюдения (рис. 1–5). При этом признаков воспаления в альвеолах не обнаружено. Несмотря на воспаление, Перлс-позитивные клетки в бронхах не обнаружены. В гистологической картине легких по прошествии 21 сут после окончания курса ингаляции обращает на себя внимание утолщение мышечной оболочки бронхов среднего калибра и легочных артериальных сосудов.

Анализируя полученные данные о развитии острой воспалительной реакции в воздухоносном и респираторном отделах легких экспериментальных животных, можно предположить экстрацеллюлярное нахождение наночастиц Fe_3O_4 в легких в течение всего периода наблюдения. Выраженность гистологических

изменений в структуре легких в течение всего срока эксперимента не снижалась. Этим, вероятно, обусловлена и

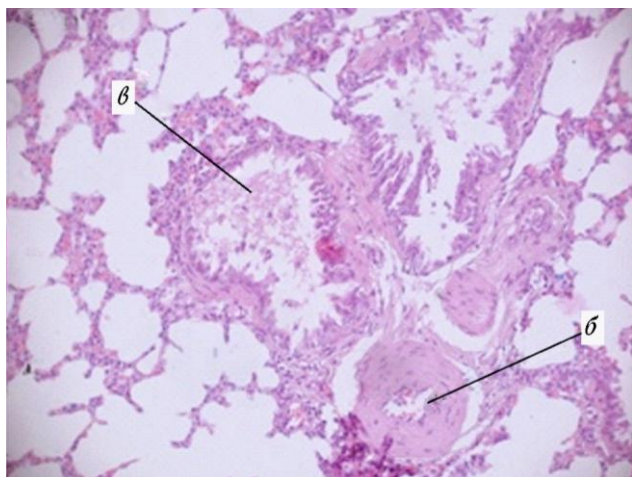
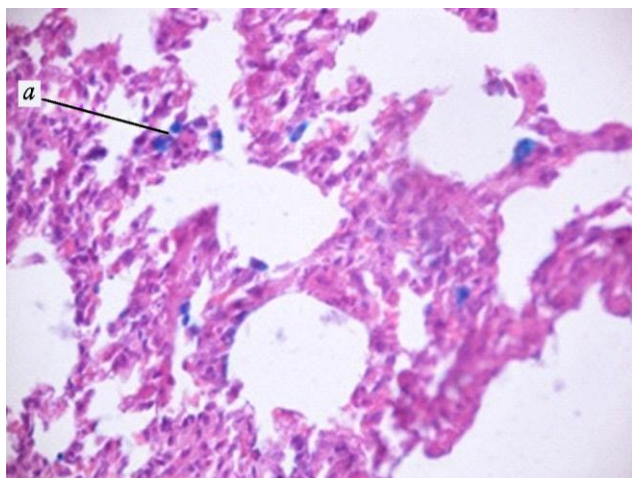


Рис. 2. Легкое животного опытной группы, выведенного из эксперимента через 9 сут: *a* – очаговые скопления Перлс-позитивных клеток системы активных фагоцитов легких; *б* – утолщение стенки артерии; *в* – экссудат в просвете бронхов. Окраска гематоксилином и эозином и по методу Перлса. Ув. 200

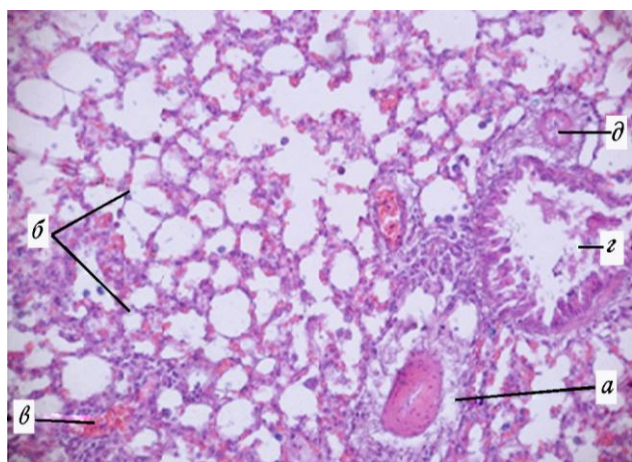


Рис. 3. Легкое животного опытной группы, выведенной из эксперимента через 15 сут: *a* – периваскулярный отек; *б* – Перлс-

позитивные макрофаги в просветах альвеол и в межальвеолярных перегородках; *в* – гиперемия сосуда; *г* – экссудат в просвете бронха; *д* – жидкость бледно-розового цвета с небольшим количеством эритроцитов. Окраска гематоксилином и эозином и по методу Перлса. Ув. 200

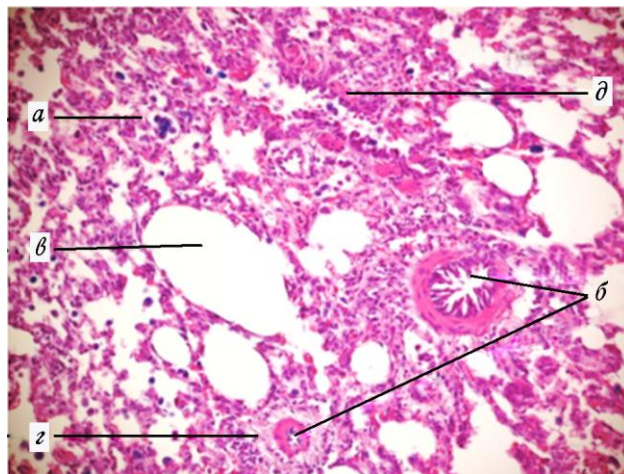


Рис. 4. Легкое животного опытной группы, выведенного из эксперимента через 21 сут: *a* – Перлс-позитивные альвеолярные макрофаги; *б* – уменьшение просвета артерии и мелкого бронха; *в* – локальное эмфизематозное расширение просветов альвеол; *г* – умеренный периваскулярный отек; *д* – гиперемия микроциркуляторного русла. Окраска гематоксилином и эозином и по методу Перлса. Ув. 200

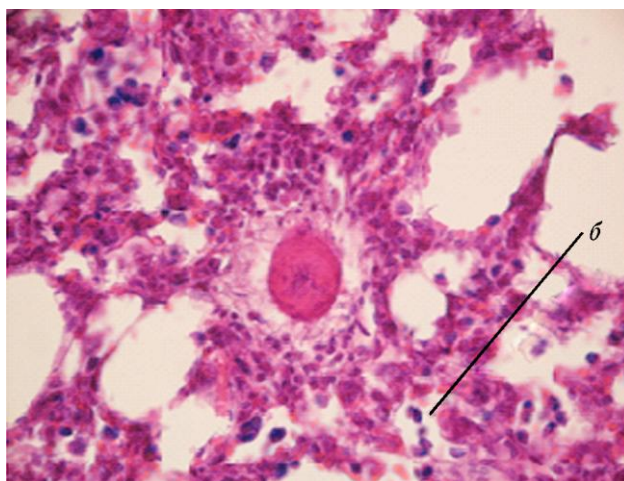
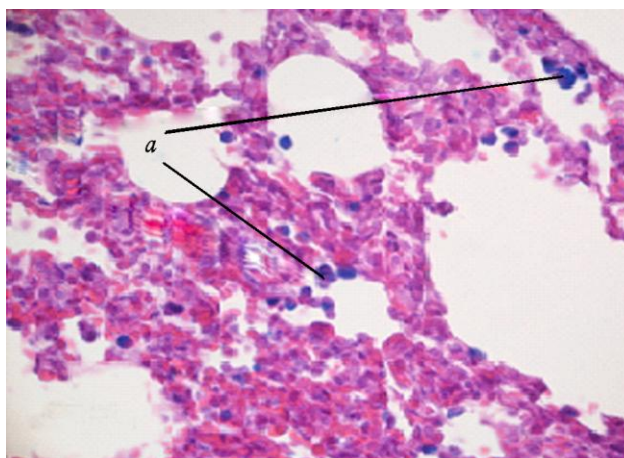


Рис. 5. Легкое морской свинки опытной группы, выведенной из эксперимента через 29 сут: *a* – очаговое скопление Перлс-позитивных клеток системы активных фагоцитов легких; *b* – диффузное распределение Перлс-позитивных клеток системы активных фагоцитов легких. Окраска гематоксилином и эозином и по методу Перлса. Ув. 200

волнообразная динамика изменения количества Перлс-позитивных альвеолярных и интерстициальных макрофагов в прикорневой зоне легкого.

Заключение

Таким образом, наблюдаемые морфологические изменения могут являться результатом непосредственного и опосредованного действия наночастиц на тканевые компоненты исследуемого органа. Воздействие наночастиц приводит к нарушению микроциркуляции, активации плазменных белковых систем, освобождению клеточных медиаторов и, как следствие, ишемическому, токсическому или рецепторопосредованному повреждению тканей [11].

Отсутствие факта гибели животных, а также характер обнаруженных изменений в легких морских свинок свидетельствуют о возможных компенсаторных реакциях организма на введение частиц наноматериала, исход которых на данном этапе трудно прогнозировать. Полученные результаты свидетельствуют о том, что элиминация поступивших ингаляционно частиц в организме морских свинок спустя месяц продолжается, поскольку выраженность морфологических изменений в структуре легких не уменьшается, а только нарастает.

Литература

1. Пальцев А., Киселёв И. Нанотехнологии в медицине //

- Свешников вестник российской академии наук. 2009. Т. 79, № 7. С. 627–636.
2. Шуленбург М. Наночастицы – крохотные вещества с огромным потенциалом. Возможности и риски / М. Шуленбург. Кёльн: Федеральное министерство образования и научных исследований (BMBWF) «Наноматериалы: новые вещества», 2008. С. 32–38.
 3. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Зялялов Р.Р. Токсичность искусственных наночастиц // Казан. мед. журн. 2009. Т. 90, № 4. С. 578–584.
 4. Шевцова Н.М., Падеров Ю.М., Степовая Е.А., Байков А.Н. Влияние ультрадисперсного полиметаллического порошка на морфологическое состояние легких экспериментальных животных // Бюл. СО РАМН. 2005. № 4 (118). С. 90–92.
 5. Kapilevich L.V., Dyakova E.Yu., Nosarev A.V. et al. Effect of nanodisperse ferrite cobalt (CoFe₂O₄) particles on contractile reactions in guinea pigs airways // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2010. V. 149, № 1. P. 70–72.
 6. Stoeger A. et al. Inhalation of ultrafine carbon particles triggers biphasic pro-inflammatory response in the mouse lung // Eur. Respir. J. 2006. V. 28, № 2. P. 275–285.
 7. Парамонов Б.А., Зиновьев Е.В., Маджанова Е.Р., Шилович В.А. Новые подходы к лечению комбинированных ожоговых поражений // Сб. науч. работ врачей ЛенВО. СПб., 2003. С. 52–53.
 8. Каплевич Л.В., Зайцева Т.Н., Носарев А.В., Дьякова Е.Ю. и др. Влияние наноразмерных частиц феррита кобальта на сократительные реакции гладкомышечных сегментов воздухоносных путей // Рос. физиолог. журн. им. И.М. Сеченова. 2012. Т. 98, № 2. С. 228–235.
 9. Kapilevich L.V., Nosarev A.V., Dyakova E.Yu. et al. Contractile reactions of guinea pig airway smooth muscles in the presence of stannum oxide nanosized particles // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2012. V. 153, № 1. P. 98–100.
 10. Микроскопическая техника: руководство / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. М.: Медицина, 1996. 544 с.
 11. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы // Современные наукоемкие технологии. 2006. № 6. С. 28–32.

Поступила в редакцию 23.12.2013 г.

Утверждена к печати 21.01.2014 г.

Носарев А.В. (✉) – д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Абраменко Е.Е. – ординатор кафедры кардиологии ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

Каплевич Л.В. – д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск), профессор кафедры спортивных дисциплин НИ ТПУ (г. Томск).

Дьякова Е.Ю. – д-р. мед. наук, ассистент кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Селиванова В.С. – студентка 6-го курса МБФ СибГМУ (г. Томск).

✉ **Носарев Алексей Валерьевич**, 8-923-407-9213; e-mail: avnosarev@yandex.ru

INVESTIGATED DYNAMICS OF ELIMINATION MAGNETITE NANOPARTICLES OF INHALED IN GUINEA PIGS

Nosarev A.V.¹, Abramenko Ye.Ye.¹, Kapilevich L.V.^{1,2}, D'yakova Ye.Yu.¹, Selivanova V.S.¹

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

² Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

The article presents the results of a study of the dynamics of histological changes in the guinea pigs respiratory tissues due the process of elimination after a long course of inhaled nanoparticles of magnetite. In the experimental animals lungs as a result of prolonged inhalation nanomagnetite developed an inflammatory reaction, the accumulation of Perls -positive cells. These changes were not even a month later, when the input of magnetite nanoparticles in laboratory animals.

KEY WORDS: smooth muscle cells, nanoparticles, signaling systems, inflammation.

Bulletin of Siberian Medicine, 2014, vol. 13, no. 1, pp. 62–66

References

1. Paltsev A., Kiselyov I. *Sveshnikov Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2009, vol. 79, no. 7, pp. 627–636 (in Russian).
2. Schulenburg M. *Nanoparticles – tiny particles with great potential. Opportunities and risks. BMBF, Department «Nanomaterials: new materials»*, 2008. Pp. 32–38 (in Russian).
3. Fatkhutdinova L.M., Khaliullin T.O., Zalyalov R.R. *Kazan Medical Journal*, 2009, vol. 90, no. 4, pp. 578–584 (in Russian).
4. Shevtsova N.M., Paderov Yu.V., Stepovaya Ye.A., Baikov A.N. *Bulletin of Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2005, no. 4, pp. 90–92 (in Russian).
5. Kapilevich L.V., D'yakova E.Yu., Nosarev A.V. et al. Effect of nanodisperse ferrite cobalt (CoFe₂O₄) particles on contractile reactions in guinea pigs airways. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2010, vol. 149, no. 1, pp. 70–72.
6. Stoeger A. et al. Inhalation of ultrafine carbon particles triggers biphasic pro-inflammatory response in the mouse lung. *Eur. Respir. J.*, 2006, vol. 28, no. 2, pp. 275–285.
7. Paramonov B.A., Zinoviev Ye.V., Madzhanova Ye.R., Shilovich V.A. New approaches to the treatment of combined burn defeats. *Collection of scientific articles of doctors of the Leningrad Military District*. St. Petersburg, 2003. Pp. 52–53 (in Russian).
8. Kapilevich L.V., Zaitseva T.N., Nosarev A.V., Dyakova E.Yu. et al. *Russian Physiological Journal named after I.M. Sechenov*, 2012, vol. 98, no 2, pp. 228–235 (in Russian).
9. Kapilevich L.V., Nosarev A.V., Dyakova E.Yu. et al. Contractile reactions of guinea pig airway smooth muscles in the presence of stannum oxide nanosized particles. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2012, vol. 153, no. 1, pp. 98–100.
10. *Microscopic techniques*. Ed. by D.S. Sarkisov, and Yu.L. Perov. Moscow, Medicine Publ., 1996. 544 p. (in Russian).
11. Chesnokova N.P., Ponukalina Ye.V., Bizenkova M.N. *Modern High Technologies*, 2006, no. 6, pp. 28–32 (in Russian).

Nosarev A.V. (✉), Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Abramenko Ye.Ye., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Kapilevich L.V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation; Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation.

Dyakova Ye.Yu., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Selivanova V.S., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Nosarev Aleksei V.**, Ph. +7-923 407-9213; e-mail: avnosarev@yandex.ru