

На правах рукописи

Мильто Иван Васильевич

Биологические эффекты внутривенного введения модифицированных
наноразмерных частиц магнетита в эксперименте

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология
03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Томск – 2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Суходоло Ирина Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор,
зав. лабораторией ультраструктурных
исследований, ФГБНУ «НИИ клинической и
экспериментальной лимфологии»

Бгатова Наталья Петровна

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории
психонейроиммунологии и нейробиологии
ФГБУ «НИИ психического
здоровья» СО РАМН

Прокопьева Валентина Даниловна

доктор медицинских наук, старший
научный сотрудник отделения
патологической анатомии и цитологии
ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»

Савельева Ольга Евгеньевна

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (г. Томск)

Защита состоится «___» _____ 201__ г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д. 208.096.03 при ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и на сайте www.ssmu.ru

Автореферат разослан «___» _____ 201_ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Александр Владимирович Герасимов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Применение наноматериалов в различных областях деятельности человека требует полного понимания потенциальных рисков, сопряженных с их внедрением. Изменение фундаментальных и возникновение новых физико-химических свойств (механических, каталитических, биологических и др.) у традиционных материалов при их переходе в нанодисперсное состояние открывают перспективы для решения ряда задач современной биологии и медицины [Hilger I. et al, 2002; Jendelova P. et al, 2004; Бруснецова Т.Н. и др., 2005; Gupta A.K. et al, 2005, 2007; Найден Е.П. и др., 2009; Hanini A. et al, 2011].

В научной литературе последних лет большое внимание уделяется рассмотрению вопросов, связанных с биомедицинским применением наноразмерных частиц [Alexiou C. et al., 2003; Donaldson K. et al., 2004; Коваленко Л.В. и др., 2006; Звездина Н.Д. и др., 2007; Hilger I. et al., 2012].

Среди металлических наноразмерных материалов (магнетит, железо, медь, золото, оксид титана и др.) [Lee K.P. et al., 1985; Warheit D.B. et al., 2003; Gould P., 2006; Петрова О., 2007; Ермаков А.Е. и др., 2009] особое место занимают магнитные наночастицы [Weissleder R. et al., 1989; Pankhurst Q.A., 2003; Найден Е.П. и др., 2006; Lee J.-H. et al., 2007; Акопджанов А.Г. и др., 2010]. Небольшое число работ по изучению влияния магнитных наноматериалов на морфо-функциональное состояние внутренних органов в эксперименте определяет исключительную важность подобных исследований [Kim J.S. et al. 2006; Добрецов К.Г. и др., 2010; Hanini A. et al., 2011; Babadi V.I. et al., 2012].

НЧМ (наноразмерные частицы магнетита) выгодно сочетают выраженные магнитные свойства, устойчивость к окислению и умеренную токсичность (LD 50 для магнетита при внутривенном введении превышает 400 мг/кг массы тела) [Бруснецов Н.А., 1996; Pardoe H. et al., 2001; Найден Е.П. и др., 2006; Терехова О.Г. и др., 2008; Aqil A. et al., 2008].

НЧМ изучаются как основа для создания высокоэффективных систем очистки биологических жидкостей, магнитоуправляемых носителей для целевой доставки лекарственных средств, терапевтических агентов для локальной гипертермии, а также как контрастные средства при магнитно-резонансных исследованиях [Bonnemain B., 1998; Perez J.M. et al., 2002; Jendelova P. et al., 2004; Gu H. et al., 2006; Загребин Л.В. и др., 2008].

Следует отметить, что представления о потенциальных угрозах, отдаленных последствиях применения, токсичности НЧМ и др. также полностью не сформированы [Lee K.P. et al., 1985; Lubbe A.S. et al., 1996; Rosi N.L. et al., 2005; Lam C.-W. et al., 2006]. Недостаточно изучены фармакокинетика и фармакодинамика НЧМ, неоднозначно определены органы-мишени и характер вызываемых в них изменений после введения НЧМ в организм [Weissleder R. et al., 1989; Kim J.S. et al., 2006; Добрецов К.Г. и др., 2010]. Ситуация осложняется тем, что токсичность наночастиц сильно варьирует в зависимости от качественного состава материала, размера его структурных элементов, способа введения в организм и может быть обусловлена различными механизмами

[Chouly C. et al., 1996; Dick C.A. et al., 2003; Jiang W. et al., 2008; Jones C.F. et al., 2009].

С целью преодоления токсических эффектов немодифицированных НЧМ применяется их покрытие биологически инертными веществами или поверхностная модификация [Pardoe H. et al., 2001; Zhang Y. et al., 2002; Lemarchand C. et al., 2004; Petri-Fink A. M. et al., 2005; Zhang Y. et al., 2005]. Среди конструкций, которые снижают токсичность наноматериалов и способствуют усилению их положительных свойств, особое внимание уделяется наночастицам, покрытым липидами (липосомы и мицеллы) или полисахаридами (микросферы) [Ito A. et al., 2003]. Модификация НЧМ вызывает повышение их стабильности в растворе, снижает реакционную способность, усиливает биосовместимость и эффективность адресной доставки, а также изменяет фармакокинетику и фармакодинамику самих частиц [Liao M.-H. et al., 2001; Zhang Y. et al., 2002; Guedes M.H.A. et al., 2005; Zhang Y. et al., 2005; Hossann M. et al., 2007]. Понимание последствий внутривенного применения модифицированных НЧМ для организма в эксперименте является исключительно важным элементом при разработке их биомедицинских приложений.

Сведения о влиянии модифицированных магнитных наноматериалов на организм животных и человека плохо систематизированы и зачастую противоречивы [Neerman M.F. et al., 2004; Nel A. et al., 2006; Igarashi E., 2008]. Отсутствуют данные об отдаленных эффектах модифицированных НЧМ (более 40 суток) на организм. Эти обстоятельства послужили поводом для проведения настоящего исследования.

Степень разработанности темы. Несмотря на то, что магнитные наноматериалы изучаются более 30 лет, биологические свойства ни одного из них не изучены в полном объеме. Преобладающее количество работ направлено на изучение эффектов НЧМ *in vitro* на уровне отдельных молекул (белков, нуклеиновых кислот и др.) [Koneracka M. et al., 1999; Krofitz F., 2003; Беликов В.Г. и др., 2004; Kouassi G.K. et al., 2005; Gu H. et al., 2006; Dobson G., 2006] и клеточных культур (перитонеальные макрофаги мыши, фибробласты кожи человека, опухолевые клетки и др.) [Pankhurst Q.A. et al., 2003; Guedes M.H.A. et al., 2005; L'Azou V. et al., 2008; Новицкий В.В. и др., 2011]. Сравнительно мало работ, посвящено исследованию влияния различных видов наноматериалов на организм [Bonnemain V., 1998; Moore A. et al., 2000; Park J.W., 2002; Jendelova P. et al., 2004; Kim J.S. et al., 2006; Nishimori H. et al., 2009]. Несмотря на широкое экспериментальное изучение НЧМ, все еще нет однозначных представлений о механизмах их преобразования в организме, их элиминации, а также о негативных эффектах, связанных с их введением. Особенно мало изученным аспектом являются отдаленные последствия парентерального введения наноматериала [Weissleder R. et al., 1989; Moore A. et al., 2000; Ito A. et al., 2005].

Цель исследования: изучить структурно-функциональное состояние внутренних органов и метаболизм железа у крыс после внутривенного введения

суспензий модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом на основе НЧМ.

Задачи исследования:

1. Изучить распределение и элиминацию модифицированных НЧМ во внутренних органах крыс после однократного внутривенного введения суспензий покрытых хитозаном НЧМ и магнитолипосом на основе НЧМ в течение эксперимента.

2. Изучить влияние модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом на основе НЧМ после однократного внутривенного введения их суспензий на морфо-функциональное состояние печени, легкого, почек, сердца, головного мозга, семенников и селезенки крыс на 1, 7, 14, 21, 40, 60, 90 и 120 сутки.

3. Оценить динамику активности органоспецифичных ферментов и концентрацию метаболитов крови, отражающих функциональное состояние печени, сердца и почек крыс после однократного внутривенного введения суспензий модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом на основе НЧМ в течение эксперимента.

4. Выявить особенности метаболизма железа у крыс после однократного внутривенного введения суспензий модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом на основе НЧМ на протяжении эксперимента.

5. Определить содержание свободных радикалов и общую антиоксидантную активность плазмы крови после внутривенного введения суспензий модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом на основе НЧМ в течение 120 суток.

Научная новизна. Впервые проведена комплексная оценка динамики биологических эффектов НЧМ, модифицированных хитозаном и липидами, после однократного внутривенного введения крысам их суспензий. Выявлен комплекс обратимых морфологических и биохимических изменений во внутренних органах крыс, обусловленных введением магнитолипосом и микросфер на основе НЧМ. Продемонстрировано взаимодействие модифицированных НЧМ с некоторыми гисто-гематическими барьерами: изученные наноконструкции проникают в семенники, но не выявляются в головном мозге. Впервые проведен ультраструктурный анализ функционально ведущих клеточных популяций печени, легких, почек и селезенки крыс после введения суспензии модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом на основе НЧМ. Иммуногистохимическим методом впервые показана динамика количества МНФ, накапливающих НЧМ, в печени, легких, почках и селезенке крыс. Впервые определена динамика содержания железа в печени, легких, почках и селезенке крыс после введения суспензий модифицированных НЧМ. Установлены конкордантные изменения активности внутриклеточных ферментов гепатоцитов, кардиомиоцитов и нефроцитов проксимальных извитых канальцев после введения суспензий модифицированных НЧМ в динамике. Показано влияние магнитолипосом и микросфер на основе НЧМ на активность органоспецифичных ферментов и метаболитов плазмы крови крыс. Установлены прооксидантные свойства модифицированных НЧМ и

продемонстрировано их стимулирующее влияние на антиоксидантные системы плазмы крови. Впервые проведено сравнение морфологических и биохимических изменений, вызванных введением крысам магнитных микросфер и магнитолипосом с действием немодифицированных НЧМ; показано снижение выраженности морфо-функциональных изменений во внутренних органах крыс после введения суспензий модифицированных НЧМ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены новые данные фундаментального характера, раскрывающие морфологические и биохимические аспекты взаимодействия НЧМ с клетками, тканями и органами крыс. Продемонстрировано вовлечение железа, входящего в состав НЧМ, в метаболизм, что сопровождается изменением основных параметров обмена железа и антиоксидантных свойств плазмы крови. Показано, что НЧМ проникают в МНФ внутренних органов крыс механизмом эндоцитоза. Кроме того, установлено, что модификация НЧМ хитозаном и липидами способствует ускорению их выведения из организма животного.

Отсутствие гибели животных, снижение выраженности и продолжительности морфологических и биохимических изменений в изученных органах в ответ на введение модифицированных НЧМ по сравнению с немодифицированными, свидетельствует о снижении токсичности НЧМ и открывает перспективы для создания на их основе новых лекарственных и диагностических средств. На основании результатов исследования возможна разработка биосовместимых магнитоуправляемых носителей для целевой доставки препаратов.

Методология и методы исследования. Междисциплинарный и многоуровневый подход к изучению проблемы, дизайн эксперимента, а также сочетание традиционных и современных методов призваны обеспечить достижение поставленных задач. Набор методов является необходимым и достаточным для получения результатов, отвечающих цели и задачам исследования. В работе применены: метод динамического светорассеяния, рентгено-флуоресцентный метод, трансмиссионная электронная микроскопия, магнитно-резонансная томография, атомно-эмиссионная спектрометрия, гистологические, гистохимические, гистоэнзимологические, иммуногистохимические, колориметрические и иммунотурбидиметрические методы, а также методы статистической обработки.

Положения, выносимые на защиту:

1. Поверхностная модификация НЧМ хитозаном и липидами улучшает физико-химические параметры суспензий модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом на основе НЧМ.

2. Однократное внутривенное введение суспензии модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом в дозе 50 мг(Fe)/кг_{массы тела} сопровождается их поглощением МНФ селезенки, печени, легких, почек, семенников крыс и вызывает обратимые изменения морфо-функционального состояния изученных внутренних органов.

3. Однократное внутривенное введение суспензий модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом вызывает изменение активности

внутриклеточных ферментов, ответственных за энергетический и пластический метаболизм гепатоцитов, кардиомиоцитов и нефроцитов крыс.

4. Внутривенная инъекция модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом вызывает увеличение содержания железа в печени, легких, почках и селезенке крыс, а также сопровождается обратимыми изменениями показателей его метаболизма в плазме крови.

5. Введение модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом вызывает кратковременные конкордантные изменения активности ряда органоспецифичных ферментов и концентрации метаболитов в плазме крови, а также обратимое увеличение общей антиоксидантной активности последней.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечивается большим объемом экспериментального материала (320 животных), набором современных методов, использованием высокотехнологичного оборудования и корректных подходов к статистической обработке.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на X Конгрессе международной ассоциации морфологов (г. Ярославль, 2010); VIII Всероссийской конференции по патологии клетки (Москва, 2010); 2-ой Международной школе «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина» (Москва, 2011); III эмбриологическом симпозиуме Всероссийского научного общества анатомов, гистологов, эмбриологов «ЮГРА-ЭМБРИО-2011» (г. Ханты-Мансийск, 2011); Международной конференции «Опто-, наноэлектроника, нанотехнологии и микросистемы» (г. Ульяновск, 2011); XI Конгрессе международной ассоциации морфологов (г. Самара, 2012); Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы морфологии, адаптогенеза и репаративных гистогенезов», посвященной памяти член-корр. АМН СССР Ф.М. Лазаренко (г. Оренбург, 2013); объединенном XII Конгрессе международной ассоциации морфологов и VII Съезде всероссийского научного общества анатомов, гистологов и эмбриологов России (г. Тюмень, 2014).

Работа поддержана грантом на выполнение прикладных научно-исследовательских работ ГК № 454 от 26.10.2012.

По материалам диссертации опубликовано 20 работ, из них 12 полнотекстовых статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и 1 монография.

Диссертация изложена на 382 страницах машинописного текста, состоит из введения, основной части (глав «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты собственных исследований» «Обсуждение результатов собственных исследований»), заключения, списка сокращений, списка литературы и приложений. Библиографический указатель работы включает 398 источников, из которых 115 отечественных и 283 зарубежных. Работа иллюстрирована 111 рисунками и 51 таблицей.

Автор принимал непосредственное участие в планировании, выполнении и обработке результатов работы. Результаты получены и проанализированы автором лично.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на 320 беспородных половозрелых крысах-самцах, массой 200 ± 30 г, из которых было сформировано 6 групп: 1-я группа (40 крыс) – интактные животные – In (Intact); 2-я группа (40 крыс) – однократное внутривенное введение эмульсии полых липосом ($120 \text{ мг(липидов)/кг}_{\text{массы тела}}$, 3 мл) – HL (Hollow Liposome); 3-я группа (40 крыс) – однократное внутривенное введение раствора хитозана ($6,25 \text{ мг(хитозана)/кг}_{\text{массы тела}}$, 2,5 мл) – CS (Chitosan-Solution); 4-я группа (40 крыс) – однократное внутривенное введение суспензии немодифицированных НЧМ ($50 \text{ мг(Fe)/кг}_{\text{массы тела}}$, 2 мл) – NM (Nanoparticles of Magnetite); 5-я группа (80 крыс) – однократное внутривенное введение суспензии покрытых хитозаном НЧМ ($50 \text{ мг(Fe)/кг}_{\text{массы тела}}$, 2,5 мл) – MC (Magnetite-Chitosan); 6-я группа (80 крыс) – однократное внутривенное введение суспензии магнитолипосом на основе НЧМ ($50 \text{ мг(Fe)/кг}_{\text{массы тела}}$, 3 мл) – ML (Magnetite-Liposome).

Содержание, питание, уход и выведение крыс из эксперимента осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 755 от 12.08.1987 г.) и Федерального Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г.

Выведение животных из эксперимента проводили методом декапитации под эфирным наркозом [Западнюк И.П., 1983] через 1, 7, 14, 21, 40, 60, 90 и 120 суток после инъекции, взятие материала у животных всех групп производили в одни и те же сроки. Исследовали печень, почки, лёгкие, сердце (левый желудочек), селезенку, головной мозг (лобная доля), семенники и плазму крови крыс.

НЧМ ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$), используемые в работе, получены механохимическим способом в Отделе структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН (г. Томск). Синтезированные НЧМ представлены агломератами размером 200 – 300 нм, состоящими из сферических частиц, средний диаметром 7 нм. Площадь удельной поверхности НЧМ $150 \text{ м}^2/\text{г}$.

Суспензию немодифицированных НЧМ для внутривенного введения готовили путем растворения нанопорошка магнетита в водно-солевом стабилизирующем растворе (рН 7,4), содержащем хлорид натрия, натрия цитрат (РЕАХИМ, Россия) и динатриевую соль ГЭПЭС (AppliChem GmbH, Германия) [Martina M.S. et al., 2005; Fortin-Ripoche J.P., 2006; Mikhaylov G. et al., 2011]. Полученную суспензию последовательно подвергали сонификации на ультразвуковом дезинтеграторе и центрифугированию. Супернатант отбирали и фильтровали через поликарбонатные фильтры (Sartorius, Германия) с диаметром пор – 100 нм под избыточным давлением (15 атм.) аргона.

Для получения эмульсии полых липосом и суспензии магнитолипосом на основе НЧМ использовали: 1,2-дипальмитоил-глицеро-3-фосфохолин - DPPC, 1,2-дистеароил-глицеро-3-фосфохолин – DSPC, 1,2-дистеароил-глицеро-3-

фосфоэтаноламин - DSPE, холестерол - Chol и α -токоферола ацетат – TA (Sigma Aldrich, Япония). Липиды растворяли в хлороформе, после чего на роторном испарителе при 56°C формировали липидную плёнку. Молярные соотношения липидов: DPPC:DSPC:Chol:DSPE:TA = 9:1:0,2:0,02:0,2 [Тазина Е.В., 2010; Mikhaylov G. et al., 2011].

При получении эмульсии полых липосом липидную пленку гидратировали 15 мл стабилизирующего раствора. Для получения магнитолипосом пленку гидратировали 15 мл суспензии немодифицированных НЧМ. Образовавшиеся после гидратации липидных пленок эмульсию и суспензию переносили в рабочую камеру экструдера и фильтровали через поликарбонатные фильтры (Sartorius, Германия) с размером пор 100 нм при 40 С под избыточным давлением аргона.

Хитозан (Sigma Aldrich, Япония) для приготовления суспензии модифицированных им НЧМ растворяли в водном растворе лимонной кислоты (РЕАХИМ, Россия), после чего раствор хитозана (1 г_{хитозана}/л) и суспензию немодифицированных НЧМ (в соотношении 1:1) перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре. Доводили рН полученной суспензии до 7,4 и подвергали сонификации на ультразвуковом дезинтеграторе [Chang, Y., 2005]. Суспензию фильтровали через поликарбонатные фильтры (Sartorius, Германия) с диаметром пор – 100 нм под избыточным давлением аргона, после чего использовали для исследования.

Концентрацию железа в суспензиях определяли рентгено-флуоресцентным методом (спектрометр Quant'X, Thermo Scientific, Швейцария). Установление распределения частиц по размерам в суспензиях методом динамического светорассеяния и определение зетта-потенциала проводили на лазерном анализаторе размерности Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Форму и структуру частиц в суспензии устанавливали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-100 CX II (JEOL, Япония).

Томографическое исследование крыс осуществляли на МРТ-сканере Toshiba Vantage с индукцией поля 1,5Т и на МРТ-сканере Magnetom Open с индукцией поля 0,2Т. МРТ крысам проводили на 1, 40, 90 и 120 сутки эксперимента. Животных наркотизировали ингаляционно диэтиловым эфиром, дополнительного введения каких-либо препаратов не осуществляли [Knike G.J. 2000; Мэнсфилд П., 2005]. МРТ-исследование проводилось в продольных (фронтальных) и поперечных (аксиальных) плоскостях в T1(спин-решетчатом)- и T2(спин-спиновом)-взвешенном режиме, с охватом всего тела животного. На фронтальных срезах для печени, легких и почек животных рассчитывалась интенсивность T2-взвешенного изображения в аппаратных единицах.

Печень, легкие, почки, сердце, головной мозг, селезенку и семенники для гистологического и иммуногистохимического исследования, а также гистохимического выявления железа фиксировали в 10% забуференном формалине (БиоВитрум, Россия, рН 7,4), затем промывали, обезвоживали в изопропанолу (БиоВитрум, Россия) и заливали в парафиновую смесь

HISTOMIX (БиоВитрум, Россия) [Саркисов В.М., 2002; Криволапов, Ю.А. и др., 2006]. С целью идентификации в тканях ионов Fe(III), которые входят в состав НЧМ, использовали гистохимическую реакцию с ферроцианидом калия - метод Перлса [Пирс Э., 1962]. Срезы обрабатывались по методу Перлса, после чего докрашивались гематоксилином и эозином [Меркулов Г.А., 1972; Bancroft J.D., 2007].

Для иммуногистохимического выявления МНФ в печени, легких, почках и селезенке крыс использовали моноклональные мышинные антитела (CD 68 и CD 163) Novocastra Laboratories (Великобритания) и Thermo Scientific (США), реагирующие с антигенами крысы. Параллельно с выявлением антигенов при каждом окрашивании проводили постановку положительного и отрицательного контроля [Саркисов В.М., 2002; Криволапов, Ю.А. и др., 2006].

Морфометрию проводили, подсчитывая количество клеток в поле зрения, с последующим пересчетом на 1 мм^2 среза соответствующего органа [Автандилов Г.Г., 1990; Гуцол А.А. и др., 1990]. На гистохимических препаратах печени, легкого, почек и семенников крыс подсчитывали общее количество Перлс-положительных клеток и их отдельных классов. На иммуногистохимических препаратах печени, легких и почек крыс считали количество CD68⁺ и CD163⁺ клеток.

Перлс-положительные клетки исследованных органов в зависимости от количества Перлс-положительных гранул, выявляемых на светооптическом уровне в их цитоплазме, были разделены нами на 3 класса:

1 класс - клетки, цитоплазма которых переполнена Перлс-положительными гранулами (более 30 в клетке).

2 класс - умеренно нагруженные клетки, содержащие Перлс-положительные гранулы, выявляющиеся по отдельности.

3 класс - клетки, имеющие единичные Перлс-положительные гранулы (не более 5 в клетке).

Фрагменты печени, почек и сердца для гистоэнзимологического исследования замораживали в охлажденном жидким азотом петролейном эфире и хранили при -75°C . На срезах каждого из перечисленных выше органов определяли активность СДГ, ЛДГ, ГАФДГ, ГлудГ, Г-6-ФДГ, ГБДГ и ЩФ. Активность перечисленных выше ферментов выявляли в соответствии с рекомендациями З. Лойды и соавт. [Ллойда З. и др., 1982]. Количественную оценку активности ферментов производили на микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ (СССР) в проходящем свете (длина волны 546 нм). Оптическую плотность измеряли не менее чем в 50 клетках препарата: в печени – гепатоциты всех отделов печеночной дольки, в сердце – кардиомиоциты, в почке - эпителиоциты проксимальных извитых канальцев.

Для ультраструктурного исследования печени, легких, почек и селезенки крыс фрагменты органов ($V \approx 2-4 \text{ мм}^3$) фиксировали при 4°C в 4% параформальдегиде на буфере Хэнкса (рН 7,4), затем в 1% OsO₄ на том же буфере. Обезвоживали в этиловом спирте, после чего заливали в смесь эпоксидных смол. Полутонкие (1 мкм) и ультратонкие (80 нм) срезы готовили

на ультратоме Leica EM UC 7 (Leica, Австрия). Полутонкие срезы окрашивали водным раствором азура II на буре. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, после чего изучали на электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, Япония) [Уикли Б., 1975].

Содержание железа в печени, легких, селезенке и почках крыс определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии (спектрометр iCAP 6300 Duo, Thermo Scientific, США), впоследствии пересчитывая на 1 кг массы соответствующего органа – мг/кг.

Плазму крови получали, используя пластиковые вакуумные пробирки (Venasafe, Италия), содержащие ЭДТА. Кровь собиралась у интактных, контрольных и опытных животных натошак. После центрифугирования крови (1000 g, $R_{\text{ротора}}=10$ см) плазму крови собирали в эппендорфы и хранили при температуре -10°C [В.В. Меньшиков, 2002].

В плазме крови определяли концентрацию железа (мкмоль/л) и свободную (ненасыщенную) железосвязывающую способность (мкмоль/л) прямым колориметрическим методом без депротеинизации; концентрацию церулоплазмينا (мг/дл) и трансферрина (мг/дл) - иммунотурбидиметрическим методом; концентрацию ферритина (нг/мл) - латексным иммунотурбидиметрическим методом.

Активность органоспецифичных ферментов (Ед/л): АлАТ, АсАТ, ЩФ, γ -ГТ, КФК-МВ, а также концентрацию мочевины (ммоль/л), креатинина (мкмоль/л), мочевой кислоты (мкмоль/л), общего и прямого билирубина (мкмоль/л) в плазме крови определяли на автоматических биохимических анализаторах Hitachi-911 (Hitachi, Япония) и CS-T240(Dirui, КНР).

Содержание свободных радикалов и общую антиоксидантную активность плазмы крови определяли хемилюминесцентным методом на полуавтоматическом люминометре (Lumat LB 9507). Результаты представлены в относительных единицах света – RLU (1 RLU=10 фотонов), которые испускает 1 мл пробы за 1 с ($\text{RLU} \cdot \text{мл}/\text{с}$). О содержании свободных радикалов в плазме крови судили по интенсивности её хемилюминесценции после добавления люминола [Васильев Р.Ф., 1983; Корнеев Ю.А. и др., 1986]. Общей антиоксидантной активностью называли суммарную активность плазмы крови, противостоящую свободнорадикальным процессам и обеспечиваемую всеми имеющимися в ней органическими и неорганическими соединениями [Артемьева Ю.С. и др., 2005]. Об общей антиоксидантной активности плазмы крови (D) крыс судили по разнице между исходным значением (RLU_0) хемилюминесценции пробы и интенсивностью хемилюминесценции в пробе через 1 минуту (RLU_1): $D=(|\text{RLU}_0 - \text{RLU}_1|)\text{мл}/\text{с}$.

Статистическая обработка результатов производилась с помощью статистического пакета «SPSS 11.5». Проверку распределения на соответствие нормальному проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты представлены в виде средней и стандартного отклонения ($X \pm \sigma$). Для выяснения достоверности различий средних значений морфометрических, гистохимических и биохимических показателей между экспериментальными

группами, использовали однофакторный дисперсионный анализ для независимых выборок. Для сравнения параметров внутри групп применяли однофакторный дисперсионный анализ повторных измерений для зависимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основной проблемой использования наноматериалов в медицинских и биологических целях является сложность получения стабильной водной суспензии [Gupta A.K. et al., 2005]. Наноразмерные частицы вследствие развитой удельной поверхности и избыточной энергии Гиббса, склонны к агрегации, которая приводит к их укрупнению и частичной или полной утрате уникальных свойств [Евстратова К.И. и др., 1990; Арсентьева И.П. и др., 2007]. Проблема подбора стабилизирующего раствора для наноразмерных частиц еще актуальнее в биологических исследованиях, так как помимо стабилизирующего эффекта, его компоненты не должны обладать повреждающим действием на клетки [Chan D.C.F., 1993; Bruce I.J. et al., 2005].

Водно-солевой раствор цитрата натрия, хлорида натрия и динатриевой соли ГЭПЭСа пригоден для внутривенного введения, так как его компоненты традиционно используются в биологических исследованиях [Fortin-Ripoche J.P., 2006; Панин Л.Е., 2008]. Известно, что культивирование различных клеточных линий (гепатоцитов, перитонеальных макрофагов, лимфоцитов селезенки, лимфатических узлов и крови, а также опухолевых клеток) в средах с добавлением используемого стабилизирующего раствора не вызывает повреждения этих клеток [Martina M.S. et al., 2005; Fortin-Ripoche J.P., 2006]. Кроме того, наш опыт использования этого раствора и предварительные исследования, связанные с его многократным внутривенным введением крысам в течение 40 дней (по 2 мл каждые 2 суток) демонстрируют отсутствие повреждения клеток и тканей экспериментальных животных.

С целью стерилизации растворов НЧМ для внутривенного введения мы использовали УЗ-сонификацию и фильтрацию через поликарбонатные фильтры. Кроме того, ультразвуковая обработка растворов обеспечивала разрушение агломератов НЧМ и получение суспензий с максимальным содержанием агрегатов частиц размером до 100 нм.

Для приготовления суспензий модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом использовали максимальную концентрацию немодифицированных НЧМ. Для данного стабилизирующего раствора и используемых немодифицированных НЧМ она составляет 7 мг(Fe_3O_4)/мл.

Животные всех экспериментальных групп, которые подвергались введению суспензий НЧМ (немодифицированных НЧМ, покрытых хитозаном НЧМ и магнитолипосом), получали одинаковую дозу железа (50 мг(Fe)/кг_{массы тела}), что достигалось за счет разного объема внутривенных инъекций.

Немодифицированные НЧМ находятся в суспензии в виде отдельных сферических частиц и их агломератов. Концентрация железа в растворе составила 5 мг(Fe)/мл (7 мг(Fe_3O_4)/мл), раствор является седиментационно устойчивым в течение 3-х суток ($t=25^\circ\text{C}$). Дзетта-потенциал (ζ -потенциал)

частиц стабилизированной суспензии немодифицированных НЧМ изменяется от 6 мВ до 44 мВ. Преобладающее количество частиц имеет ζ -потенциал 24,5 мВ (рН 7,4, $T=25^{\circ}\text{C}$). Методом лазерной дифракции установлено, что в суспензии немодифицированных НЧМ присутствуют агрегаты частиц от 45 нм до 300 нм, с преобладанием структур со средним размером 90,4 нм. Указанным методом определяется гидродинамический радиус, то есть размер частиц с учетом их гидратной оболочки, вследствие этой особенности размер структур в растворе всегда превышает их истинный размер [Petersson K. et al., 2006; Mikhaylov G. et al., 2011]. Для получения корректных сведений о размерах частиц и их агрегатов в растворе мы сочетали лазерную дифракцию с трансмиссионной электронной микроскопией.

Свободные модифицированные хитозаном НЧМ имеют сферическую форму, в жидкой фазе они находятся в виде отдельных частиц и их агрегатов - рис.1А. Концентрация железа в используемой суспензии составила 4 мг(Fe)/мл (5,5 мг(Fe_3O_4)/мл), раствор является седиментационно устойчивым в течение 5-и суток. Размер модифицированных хитозаном НЧМ в стабилизирующем растворе лежит в диапазоне от 15,2 нм до 79,1 нм. Средний размер их агрегатов составляет 32,5 нм. Дзетта-потенциал частиц суспензии модифицированных хитозаном НЧМ изменяется в интервале от 32,8 мВ до 69,2 мВ. Основное количество частиц имеет ζ -потенциал 50,4 мВ (рН 7,4, $T=25^{\circ}\text{C}$).

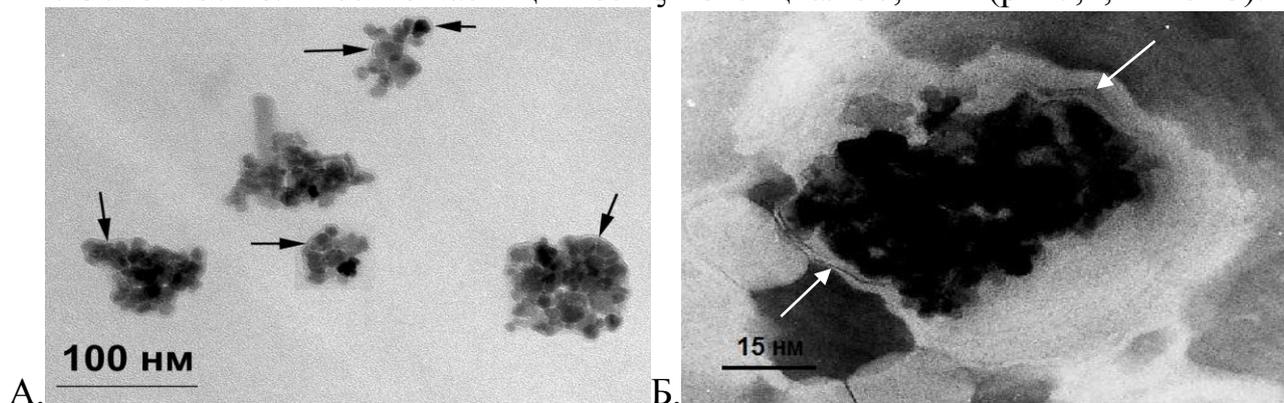


Рис.1. Суспензии модифицированных НЧМ. А. Суспензия покрытых хитозаном НЧМ. Агрегаты НЧМ в стабилизирующем растворе (стрелками показано хитозановое покрытие). Б. Суспензия магнитолипосом на основе НЧМ (стрелками показаны липидные оболочки). Трансмиссионная электронная микроскопия.

Магнитолипосомы имеют сферическую форму и представляют собой везикулы, в полости которых располагаются наноразмерные частицы/агрегаты НЧМ. Стенка магнитолипосом представлена одним или несколькими бислоями липидов. НЧМ и их агрегаты полностью окружены липидной оболочкой – рис. 1Б.

Концентрация железа в суспензии магнитолипосом составила 3,5 мг(Fe)/мл (4,8 мг(Fe_3O_4)/мл), раствор является седиментационно устойчивым 6 суток. Средний размер магнитолипосом составляет 75 нм. Наибольшее количество магнитолипосом имеют размеры до 100 нм (60-80 нм). Дзетта-потенциал магнитолипосом положителен и изменяется в интервале от 36 мВ до 65 мВ. Основное количество частиц имеет ζ -потенциал 54 мВ (рН 7,4, $T=25^{\circ}\text{C}$).

Низкая коллоидная устойчивость водно-солевой суспензии немодифицированных НЧМ, по сравнению с растворами модифицированных частиц, подтверждается самым низким дзета-потенциалом исходных частиц. Сравнительно низкую коллоидную устойчивость суспензии немодифицированных НЧМ можно объяснить отсутствием дополнительных факторов стабилизации (стерического, электрического, гидратного, термодинамического, энтропийного) у отдельных частиц и их агрегатов в суспензии [Левитин Е.Я. и др., 1998; Евстратова К.И., 1990].

Седиментационная устойчивость суспензии модифицированных хитозаном НЧМ, безусловно, связана со стабилизирующим эффектом хитозана [Mohammadi-Samani S. et al., 2013]. В растворённом виде хитозан обладает выраженными сорбционными свойствами за счет способности образовывать водородные связи с адсорбатом. Молекулы хитозана имеют большое количество свободных аминогрупп, что позволяет им связывать протоны и приобретать положительный заряд. Перечисленные свойства хитозана обеспечивают стерический и электростатический факторы седиментационной устойчивости суспензии. Кроме того, полярные функциональные группы хитозана способствуют формированию вокруг частиц гидратной оболочки, а их движение обеспечивают энтропийный фактор стабильности [Скрябин К.Г. и др., 2002].

Большая седиментационная устойчивость суспензии магнитолипосом на основе НЧМ объясняется стабилизирующим эффектом липидной оболочки и меньшей концентрацией магнетита. Полярные группы фосфолипидов обеспечивают электростатический, стерический и гидратный факторы стабильности [Грегориадис Г. и др., 1983; Марголис Л.Б. и др., 1986]. Кроме того, липидная оболочка агрегатов снижает поверхностную энергию Гиббса, повышая термодинамическую устойчивость системы. Наблюдение в течение 1 суток за размером магнитолипосом продемонстрировало увеличение среднего размера этих структур, что объясняется укрупнением липосом при их слиянии.

Наличие в суспензии магнитолипосом (по данным электронной микроскопии) немодифицированных НЧМ и их агрегатов может быть связано с неполной инкапсуляцией наноматериала, а также с возможностью утраты липидной оболочки после приготовления суспензии.

Томографическое исследование крыс проводилось для визуализации прижизненного распределения НЧМ после внутривенного введения суспензий немодифицированных частиц и конструкций на их основе, а также выявления органов с наибольшим накоплением НЧМ.

Интенсивность изображения областей печени, легких и почек животных после введения эмульсии полых липосом и раствора хитозана не отличается от фиксированной на томограммах интактных крыс.

Искажение МРТ сигнала и ухудшение качества изображения в области эпигастрия, наблюдающееся у крыс после введения суспензии немодифицированных НЧМ, начиная с 1 суток, объясняется их накоплением в печени и селезенке животных - рис. 2А. Кроме того, обращает на себя внимание

значительное снижение интенсивности и искажение сигнала в грудной полости в области расположения легких. Кумуляция НЧМ в этих органах связана с развитой в них системой МНФ [Карр Я., 1978]. Искажение МРТ сигнала объясняется физическими свойствами (суперпарамагнетизм) используемых частиц [Найден Е.П. и др., 2004, 2006; Шимановский П.Л. и др., 2009].

К 90 суткам искажение изображения на томограммах крыс, получивших инъекцию суспензии немодифицированных НЧМ, полностью исчезает, однако, сниженная интенсивность изображения в области печени и легких сохраняется, что свидетельствует о присутствии в этих органах НЧМ. Интенсивность изображения исследуемых органов нарастает к концу эксперимента и достигает в легких (к 120 суткам) и почках (к 40 суткам) показателей, характерных для интактных крыс, тогда как интенсивность изображения печени остается сниженной в течение всего эксперимента. Рост интенсивности изображения на протяжении эксперимента и нормализация качества томограмм после введения суспензии немодифицированных НЧМ объясняется снижением содержания НЧМ в печени, селезенке, легких и почках, что обеспечивается постепенным выведением или внутриклеточным преобразованием НЧМ, накопленных в МНФ этих органов [Gellissen J. et al., 1999; Briley-Saebo K., 2004]. Следует отметить, что введение суспензии немодифицированных НЧМ меньше всего изменяет интенсивность сигнала в области почек, это, видимо, связано с относительно слабым участием последних в выведении частиц, средний размер агломератов которых – 90,4 нм.

После введения суспензии модифицированных хитозаном НЧМ снижение интенсивности изображения также наблюдаются с 1 суток, однако, оно менее выражено в печени и легких крыс, нежели после введения немодифицированных НЧМ. Существенные изменения интенсивности МРТ изображения наблюдаются в области почек крыс после введения покрытых хитозаном НЧМ и связаны с увеличением роли этого органа в выведении данной модификации магнетита. Повышением гидрофильности НЧМ при нанесении на их поверхность полисахарида, а также уменьшение среднего размера агломератов частиц, позволяют им выводиться из организма путем клубочковой фильтрации и канальцевой секреции. Полная нормализация интенсивности изображения достигается в области легких - к 40 суткам, а печени и почек - к 120 суткам – рис. 2Б. Покрытие хитозаном изменяет фармакокинетику НЧМ, стимулируя их выведение из организма почками, и уменьшая их кумуляцию в органах с развитой системой МНФ [Yuan Z.X. et al., 2009].

Магнитолипосомы кумулируются в печени, легких и селезенке крыс, что согласуется с данными литературы [Bonnemain V., 1998; Babadi V.Y. et al., 2012], интенсивность изображения этих органов по данным МРТ снижена и нормализуется в легких и почках к 90 и 120 суткам, соответственно, тогда как в печени сохраняется в течение всего эксперимента. Магнитолипосомы вызывают менее выраженное снижение интенсивности сигнала от печени и легких, по сравнению с животными, которым вводили суспензию

немодифицированных НЧМ, так как они более седиментационно стабильны, имеют меньший средний размер агломератов, вследствие чего дольше циркулируют и быстрее выводятся из организма иными, нежели поглощение МНФ, способами. В отличие от немодифицированных НЧМ, магнитолипосомы сильно снижают интенсивность изображения почек, что подтверждает повышение роли последних в выведении данной модификации НЧМ.

По сравнению с введением суспензии покрытых хитозаном НЧМ, магнитолипосомы вызывают более выраженные и продолжительные изменения интенсивности изображения, что связано с большим размером агломератов суспензии, меньшей гидрофильностью частиц, а также со способностью магнитолипосом усиливать проникновение НЧМ в клетки за счет объединения своей мембраны с плазмолеммой. Последнее увеличивает накопление НЧМ в органах и время, необходимое для их выведения из организма [Антипов С.А. и др., 2009; Шимановский П.Л. и др., 2009; Искусных И.Ю. и др., 2010]. С этим, видимо, связано и более медленное восстановление интенсивности сигнала от печени, легких и почек крыс после введения магнитолипосом по сравнению с модифицированными хитозаном НЧМ.

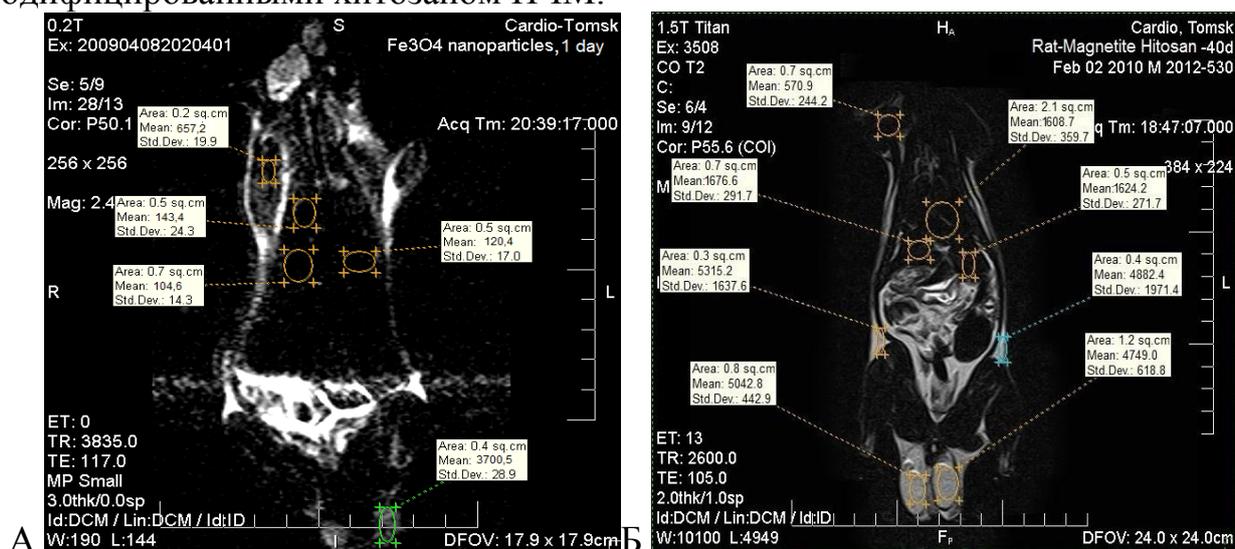


Рис.2. МРТ крысы после внутривенного введения суспензии немодифицированных НЧМ на 1 сутки (А) и покрытых хитозаном НЧМ на 40 сутки (Б). А. В области эпигастрия и грудной полости наблюдается искажение сигнала и ухудшение качества изображения. Б. Полная нормализация изображения.

Более существенное искажение МРТ сигнала после введения немодифицированных НЧМ по сравнению с покрытыми хитозаном НЧМ и магнитолипосомами объясняется более медленной кинетикой их выведения и склонностью к накоплению в организме. Из-за большого размера агломератов частиц они быстро опсонизируются и интенсивно поглощаются МНФ, что приводит к увеличению времени нахождения немодифицированных НЧМ в организме. Крупные агломераты суспензии требуют большего времени на внутриклеточное метаболизирование после поглощения, а также могут вызывать повреждение клеток [Gellissen J. et al., 1999; Briley-Saebo K. et al., 2004]. Кроме того, выведение крупных агломератов не может быть обеспечено почками.

Идентичность морфологических изменений в изученных органах крыс после введения суспензии немодифицированных НЧМ, магнитных микросфер и магнитолипосом, а также отсутствие таковых у интактных животных, крыс после введения эмульсии полых липосом и раствора хитозана свидетельствует о том, что эти изменения обусловлены НЧМ. Разная степень выраженности повреждений у крыс перечисленных групп определяется способом модификации НЧМ и связана с разным размером агрегатов частиц, временем нахождения в циркуляции и свойствами покрытия [Gref R. et al., 1994; Chang, Y. et al., 2005].

К концу исследования выраженность и распространенность наблюдаемых морфологических изменений во внутренних органах снижается у животных, всех групп получавших инъекцию НЧМ, что свидетельствует о наличии механизмов элиминации НЧМ из организма крысы [Hardonk M.J. et al., 1992; Добрецов К.Г. и др., 2010].

Сохранение морфологических изменений после инъекции немодифицированных НЧМ в течение большего времени (до 120 суток) у животных связано с более медленной скоростью выведения этих частиц, что документировано МРТ и ультраструктурным исследованием.

Структурные изменения в печени выражены наиболее ярко, что связано с её активным участием в поглощении и выведении НЧМ [Okon E. et al., 1994; N. Nishimori et al., 2009; Ma P. et al., 2012]. Изменения дисциркуляторного (спазм артерий, полнокровие вен и сосудов микроциркуляторного русла, сдвиг эритроцитов в синусоидах), дистрофического и некротического характера в печени животных проявляются наиболее ярко в ранние сроки (1-14 сутки) после введения немодифицированных НЧМ, снижаясь к 40 суткам. Вероятно, к 21 суткам организм крыс элиминирует основное количество введенного наноматериала, а компенсаторно-приспособительные реакции, возникшие в ответ на введение наноразмерных частиц, достигают максимального развития. В условиях наблюдаемых дисциркуляторных изменений возможно гипоксическое повреждение гепатоцитов, проявляющееся дистрофией и некрозом. Увеличение степени выраженности морфологических изменений в ранние сроки исследования можно объяснить прогрессирующими гипоксическими явлениями [Логинов А.С., 1994], а также токсическим повреждением гепатоцитов вследствие нарушения их внутриклеточного метаболизма, которое документировано нами в гистоэнзимологическом исследовании.

Помимо перечисленных механизмов, возможен перекисный тип повреждения гепатоцитов [Ito A. et al., 2004; Rosi N.L. et al., 2005; Gao L. et al., 2007]. Нельзя исключать участия в свободнорадикальных процессах ионов железа, освобождающихся в ходе метаболизирования НЧМ в фагосомах МФ и при диссоциации циркулирующих в сосудистом русле частиц магнетита.

Введение НЧМ, модифицированных хитозаном, сопровождается только комплексом гемодинамических расстройств, менее выраженных, чем у крыс после инъекции немодифицированных НЧМ: в гепатоцитах всех отделов

дольки констатируется зернистая дистрофия, которая рассматривается рядом авторов как вариант их функционального состояния [Гулак П.В. и др., 1985]. К 14 суткам структура гепатоцитов нормализуется. Очевидно, покрытие частиц хитозаном делает агрегаты НЧМ более гидрофильными и стабильными, уменьшая их средний размер, что приводит к их ускоренному выведению почками и более эффективному метаболизированию в фагосомах МНФ [Nam H.Y. et al., 2009; Yuan Z.X. et al., 2009; Weissleder R. et al., 2014]. Кроме того, перечисленные преимущества покрытых хитозаном НЧМ обеспечивают снижение риска эмболии сосудов микроциркуляторного русла, повреждения эндотелия и др., что объясняет снижение выраженности гемодинамических расстройств в печени по сравнению с немодифицированными НЧМ.

Более выраженные морфофункциональные изменения в печени крыс после введения магнитолипосом по сравнению с животными, получившими инъекцию покрытых хитозаном НЧМ, могут быть связаны с присутствием в суспензии магнитолипосом свободных (некапсулированных в липидную оболочку) НЧМ, а также с неспецифическим проникновением в гепатоциты НЧМ через плазмолемму за счет наличия липидной оболочки [Fahlvik, A.K. et al., 1990; Искусных И.Ю. и др., 2009].

В легких крыс после введения суспензий немодифицированных НЧМ, магнитных микросфер и магнитолипосом наблюдается комплекс однотипных дисциркуляторных изменений, которые более выражены и продолжительны (до 120 суток) после введения немодифицированных НЧМ. В легких крыс после введения немодифицированных НЧМ или их модификаций наблюдается формирование мононуклеарных инфильтратов, которые в ранние сроки располагаются периваскулярно, что, вероятно, отражает начальные этапы поглощения НЧМ из кровеносного русла. Выявление периваскулярных инфильтратов в более поздние сроки у животных после введения покрытых хитозаном НЧМ свидетельствует об отсроченном проникновении модифицированных хитозаном НЧМ в орган и о более продолжительной циркуляции. Комплекс дисциркуляторных расстройств, наблюдаемых в легких, может быть опосредован повреждением эндотелия, эмболией сосудов микроциркуляторного русла, а также влиянием на сосуды цитокинов, продуцируемых активированными НЧМ макрофагами [Decker K., 1990; van Til N.P. et al., 2005; Weissleder R. et al., 2014].

Последовательное развитие дисциркуляторных (полнокровие капилляров клубочка, расширение просвета его капсулы, интерстициальный отек, кровоизлияния, полнокровие вен коркового и мозгового вещества), дистрофических и некротических изменений в ранние сроки (до 40 суток) в почках крыс после введения немодифицированных НЧМ подтверждает их активное участие в фармакокинетике НЧМ [Okon E. et al., 1994; Guzman M. et al., 2000; L'Azou B. et al., 2008; Ma P. et al., 2012]. В исследовании Weissleder R. и соавт. показано удаление 25% покрытых декстраном НЧМ с мочой и фекалиями за 19 дней [Weissleder R. et al. 1989].

Дистрофия и некроз эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев (7-21 сутки), сопровождающие введение немодифицированных НЧМ, могут быть обусловлены ишемией, развивающейся на фоне выраженных гемодинамических расстройств. Нарастание выраженности дисциркуляторных изменений к 14 суткам обуславливает прогрессирование дистрофических изменений и приводит к некрозу эпителиоцитов проксимальных и дистальных извитых канальцев.

После введения покрытых хитозаном НЧМ и магнитолипосом в почках животных наблюдается только комплекс гемодинамических изменений. Нормализация структуры почек крыс происходит через 40 и 60 суток после инъекции модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом, соответственно. Такая разница, вероятно, обусловлена более глубокими гемодинамическими расстройствами, наблюдаемыми в почках после введения магнитолипосом по сравнению с инъекцией покрытых хитозаном НЧМ. Дисциркуляторные нарушения могут быть обусловлены интенсификацией выделительной функции почек, связанной с усилением клубочковой фильтрацией и канальцевой секрецией НЧМ. Особенно это актуально для покрытых хитозаном НЧМ, которые являются наиболее гидрофильными и имеют самый маленький средний размер агрегатов (32,5 нм), из изученных в работе НЧМ.

В селезенке животных после введения суспензии немодифицированных НЧМ незначительные дисциркуляторные нарушения (спазм центральных артерий) нормализуются к 14 суткам, что объясняется выведением основного количества НЧМ из организма крыс. Наиболее вероятным механизмом элиминации НЧМ в селезенке является преобразование магнетита в фагосомах МНФ. В кислой среде лизосом НЧМ способны деградировать с переходом железа из кристаллической формы в ионную. В селезенке крыс после введения магнитолипосом и магнитных микросфер морфологические изменения не наблюдаются вовсе. Отсутствие повреждений клеток паренхимы при относительно высоком содержании НЧМ свидетельствует о широких компенсаторных возможностях органа и высокой функциональной активности селезеночных макрофагов [Hardonk M.J., 1992], позволяющей им метаболизировать НЧМ. Селезенка активно участвует в элиминации НЧМ из системной циркуляции, используя МНФ и, таким образом, играет существенную роль в снижении их концентрации в крови. Селезенка оказывает системный протективный эффект, защищая другие органы от воздействия высокой концентрации НЧМ [Demoy M. et al., 1999; Weissleder R. et al., 2014].

Наличие во все исследованные сроки после введения НЧМ и их модификаций лишь дисциркуляторных изменений в миокарде крыс (интерстициальный отек, полнокровие капилляров и вен) говорит о том, что сердце не участвует в фармакокинетике НЧМ. Нормализация структуры миокарда наблюдается после введения модифицированных хитозаном НЧМ к 21 суткам, затем следуют магнитолипосомы (40 сутки) и немодифицированные НЧМ (60 сутки). Ранняя нормализация структуры миокарда связана со

способностью микросфер достаточно быстро выводиться почками, тогда как крупные агломераты поглощаются, главным образом, МНФ печени и селезенки.

В головном мозге крыс после введения суспензии НЧМ и модификаций на их основе наблюдается гибель пирамидных нейронов коры лобной доли и развитие глиальной реакции. Гибель нейронов, вероятно, опосредуются ишемией, которая обусловлена наличием гемодинамических расстройств в коре, а также может быть связана с инициацией НЧМ свободнорадикальных процессов, которая документирована нами при определении содержания свободных радикалов в плазме крови на фоне введения магнетита. Так как дисциркуляторные изменения (перикапиллярный и периартериальный отек, полнокровие капилляров и вен) наиболее выражены и продолжительны (до 120 суток) у крыс после введения немодифицированных НЧМ, именно в этой группе наблюдается наибольшее количество погибших нейронов; наименее выраженные и кратковременные повреждения – в коре крыс после введения покрытых хитозаном НЧМ.

После введения покрытых хитозаном НЧМ, имеющих самые маленькие размеры агломератов, появление погибших пирамидных нейронов на 1 сутки можно объяснить проникновением через ГЭБ одиночных частиц магнетита.

В семенниках крыс наблюдается только комплекс гемодинамических нарушений (полнокровие капилляров и вен межканальцевой соединительной ткани, интерстициальный отек), которые наиболее выражены у животных после введения немодифицированных НЧМ. Нарушения структуры клеток сперматогенного дифферона не выявлено ни в одной из экспериментальных групп, что можно объяснить отсутствием гемато-тестикулярного барьера. Накопление НЧМ в семенниках выражено слабо, что положительно коррелирует с уровнем развития в них системы МНФ. Гемодинамические изменения быстрее всего нивелируются в группе с введением магнитных микросфер (40 суток), затем следует группа после инъекции магнитолипосом (60 суток) и немодифицированных НЧМ (90 суток).

Изменения в изученных органах могут являться как результатом непосредственного действия НЧМ на клетки органов, так и быть опосредованными (например, нарушение микроциркуляции, за счет эмболии сосудов микроциркуляторного русла агломератами НЧМ; внутрисосудистая или внутриклеточная активация свободнорадикальных процессов; активация плазменных белковых систем (системы свертывания крови, системы комплемента и др.); инициация освобождения клеточных медиаторов клетками, участвующими в элиминации наноразмерных частиц и т.д.), которые вызывают ишемическую, токсическую или рецептор-опосредованную гибель клеток [Nemmar A. et al., 2002; Curtis A., 2003; Brown D.M. et al., 2004; Salata O.V., 2004; Guedes M.H.A. et al., 2005; Borm P. et al., 2006; Hamilton R.F. et al., 2008].

При гистохимическом выявлении Fe^{+++} по методу Перлса положительная реакция получена в МНФ печени, легкого, почек, семенников и селезенки крыс после введения суспензии немодифицированных НЧМ, модифицированных

хитозаном НЧМ и магнитолипосом. Реакция с ферроцианидом калия на препаратах головного мозга и сердца животных этих групп была отрицательной.

Реакция Перлса на препаратах печени, легкого, почек, мозга, сердца и семенников интактных животных, а также крыс после введения эмульсии полых липосом и раствора хитозана была отрицательной. Селезёнка животных этих групп во все сроки дает положительную реакцию Перлса. В красной пульпе выявляются отдельные Перлс-положительные макрофаги 2 и 3 классов, с преобладанием клеток, цитоплазма которых умеренно нагружена Перлс-положительными гранулами (2 класс).

Для подсчета Перлс-положительных клеток нами выбраны печень, легкие, почки и семенники крыс, так как в них обнаружены морфологические изменения и накопление НЧМ по данным МРТ. Селезенку, несмотря на выраженную реакцию Перлса и данные МРТ, морфометрическому исследованию не подвергали из-за высокой плотности Перлс-положительных клеток и отсутствия возможности дифференцировки макрофагов, содержащих эндогенное железо и железо в составе НЧМ [Hardonk M.J. et al., 1992; Demoy M. et al., 1999].

После введения суспензии НЧМ и их модификаций Перлс-положительное окрашивание в печени дают звездчатые макрофаги, лежащие в стенке синусоидных капилляров на всем их протяжении. Разделение звездчатых макрофагов на 3 класса, основанное на количестве Перлс-положительных гранул в их цитоплазме, играет существенную роль для понимания процессов элиминации НЧМ МНФ и отражает стадии накопления ими наноматериала. Звездчатые макрофаги, содержащие единичные гранулы, вероятно, являются клетками, которые вовлекаются в процесс рекрутирования НЧМ из циркуляции и находятся на начальной стадии их накопления. Продолжая поглощение НЧМ, они последовательно переходят сначала в клетки 2-го, а затем и 1-го класса.

В зависимости от количества поглощенных НЧМ клетки имеют различную стратегию поведения: либо гибель *in situ* (в случае поглощения большого количества НЧМ и неспособности к эвакуации), либо миграция за пределы органа, либо преобразование НЧМ в ионное железо. В литературе обсуждается возможность внутрилизосомальной деградации наночастиц различного качественного состава [Gellissen J. et al., 1999; Briley-Saebo K. et al., 2004; Kim J.S. et al., 2006; Vasir, J.K. et al., 2007; Weissleder R. et al., 2014].

Отсутствие увеличения количества звездчатых макрофагов 3 класса в поздние сроки эксперимента свидетельствует о том, что вовлечения в процесс поглощения НЧМ клеток Купфера не происходит. Основные процессы поглощения НЧМ завершены и дальнейшие изменения в системе МНФ происходят только за счет их перехода из одного класса в другой (по мере накопления или метаболизирования НЧМ), гибели, пролиферации, дифференцировки или миграции фагоцитов.

Благодаря способности к активному движению, звездчатые макрофаги могут эвакуироваться из организма путем миграции, эта способность МНФ

определяет один из основных способов выведения НЧМ [Borm P.J. et al., 2004; van Til N.P. et al., 2005; Kostarelos K. et al., 2007]. Появление и увеличение количества Перлс-позитивных макрофагов в области порталных трактов может обеспечиваться их миграцией из синусоидных капилляров к жёлчевыводящим путям и, вероятно, необходимо для их выведения в составе жёлчи [Jani P.U. et al., 1994]. Возможность выведения НЧМ макрофагами подтверждается скоплением клеток Купфера вокруг порталных трактов. Вероятно, покидать организм клетки могут на любой стадии накопления наноматериала, но, по нашим данным, наиболее часто это осуществляют клетки 1-ой и 2-ой групп, которые захватили максимально возможное количество НЧМ. Миграция фагоцитов, перегруженных НЧМ, позволяет наиболее эффективно выводить магнетит, тем более что эти клетки, вероятно, утрачивают способность полноценно выполнять свои функции. Клетки 1 класса неспособны полностью метаболизировать содержащийся в них магнетит и вернуться к нормальному функционированию, став Перлс-негативными фагоцитами. Нельзя исключать возможности обратного перехода: клетки, перегруженные НЧМ, могут превращаться в фагоциты, содержащие умеренное количество гранул, а те, в свою очередь - в клетки с единичными гранулами. Таким образом, клетки 3 класса могут быть клетками, находящимися на заключительной стадии преобразования НЧМ и, возможно, способны переходить в Перлс-негативные фагоциты. Это наблюдение хорошо согласуется с доминированием на поздних сроках эксперимента клеток 3 класса.

К 90 суткам из печени крыс, получивших инъекцию магнетита, выводится основное количество НЧМ, что подтверждается присутствием в строме лишь одиночных Перлс-позитивных клеток, а также данными ультраструктурного исследования. Большинство клеток Купфера представлены Перлс-негативными фагоцитами – это либо вновь образовавшиеся звездчатые макрофаги, либо клетки, избавившиеся от НЧМ.

Наиболее ранним исчезновением Перлс-положительных звездчатых макрофагов характеризуется печень крыс после введения модифицированных хитозаном НЧМ (60 сутки), затем следует группа с инъекцией суспензии магнитолипосом (90 сутки) и немодифицированных НЧМ (120 сутки). Раннее исчезновение Перлс-положительных клеток в печени крыс после введения покрытых хитозаном НЧМ объясняется физико-химическими свойствами поверхности магнитных микросфер. Гидрофильное покрытие из хитозана обеспечивает им возможность выводиться из организма почками, вследствие чего НЧМ меньше проникают и накапливаются в МНФ.

После введения суспензий покрытых хитозаном НЧМ и магнитолипосом Перлс-положительные клетки в области триад выявляются уже с 1 суток, что положительно сказывается на выведении магнетита и свидетельствует об ускорении его элиминации по сравнению с немодифицированными НЧМ.

В ранние сроки (до 21 суток) в легких крыс Перлс-позитивные клетки располагаются перикапиллярно в межальвеолярных перегородках

(интерстициальные макрофаги), что иллюстрирует этап начального поглощения НЧМ из крови сосудов микроциркуляторного русла. Позднее в легких животных как после введения немодифицированных НЧМ, так и после введения покрытых хитозаном и липидами НЧМ Перлс-позитивные макрофаги начинают кумулироваться перибронхиально и перибронхиолярно, что предшествует активному выходу клеток в просвет бронхиального дерева [Peters A. et al., 1997; Utell M.J. et al., 2000; Brown J.S. et al., 2002]. Преобладание в просвете альвеол, бронхиол и мелких бронхов клеток 1 класса говорит об удалении клеток, максимально нагруженных НЧМ, которые не способны осуществлять его дальнейшее поглощение, полноценно выполнять свои функции и полностью его метаболизировать. Снижение количества Перлс-позитивных макрофагов различных классов в легких крыс к концу эксперимента объясняется их перемещением в просвет бронхиального дерева и/или метаболизированием содержащегося в них магнетита с превращением в Перлс-негативные клетки. К 90 суткам после введения суспензии НЧМ и модификаций на их основе в легких крыс количество Перлс-позитивных макрофагов незначительно, что характеризует завершение процессов выведения НЧМ [Peters A. et al., 1997].

Расположение Перлс-позитивных макрофагов в легких крыс после введения НЧМ и их модификаций: перибронхиально, перибронхиолярно, а также в межальвеолярных перегородках позволяет предположить механизм удаления наноматериала из организма животных путем миграции этих клеток в просвет бронхиального дерева и выведения из организма в составе бронхиальной слизи. Это подтверждается наличием Перлс-позитивных макрофагов в просвете альвеол, бронхиол и бронхов. После введения суспензии модифицированных хитозаном НЧМ клетки 1 класса появляются в легких позже (на 7 сутки), чем после введения магнитолипосом и немодифицированных НЧМ, что связано с менее интенсивным поглощением магнитных микросфер МНФ органа и возрастанием роли иных механизмов элиминации.

Относительно небольшое количество Перлс-позитивных клеток в почках крыс всех групп, подвергшихся инъекции НЧМ, объясняется слабым развитием системы МНФ органа [Карр Я., 1978], а также выведением наноматериала другими (неклеточными) механизмами. Так, клубочковая фильтрация или канальцевая секреция обеспечивают основное выведение почками ксенобиотиков [Добрецов К.Г. и др., 2010; Yuan Z.X. et al., 2011], включая наночастицы. В процессе фильтрации возможно нарушение структуры почечного фильтра частицами наноматериала, а также повреждение нефроцитов в ходе транцитоза через них НЧМ, что приводит к наблюдаемым морфологическим изменениям.

Введение модифицированных хитозаном НЧМ характеризуется ранним исчезновением из стромы почек Перлс-позитивных клеток (90 сутки), что связано с их небольшим количеством, а также с незначительным внутриклеточным накоплением в них магнетита.

После введения немодифицированных НЧМ, а также микросфер и магнитолипосом на их основе НЧМ в обозначенных дозах нами не обнаружено проникновения наноматериала в головной мозг крыс, что хорошо согласуется с данными ряда авторов [Muldoon L.L. et al., 1999; Kreuter, J., 2004; Lockman P.R. et al., 2004]. В литературе описаны наблюдения с проникновением в мозг частиц размером не более 10-15 нм [O. Mykhaylyk et al., 2001; Lockman P.R. et al., 2004; Oberdorster G. et al., 2004], однако, в изучаемых суспензиях доля агломератов НЧМ таких размеров невелика, что подтверждено данными динамического светорассеяния и электронной микроскопии.

Интерстициальная соединительная ткань семенника содержит наряду с фибробластами и клетками Лейдига – гистиоциты [Шевлюк Н.Н. и др., 2010], которые способны осуществлять фагоцитоз НЧМ, проникающих через гематотестикулярный барьер. Присутствие этих клеток в строме органа обеспечивает поглощение НЧМ из кровеносного русла после внутривенного введения и объясняет появление Перлс-позитивных клеток после введения немодифицированных НЧМ, начиная с 40 суток, а после инъекции покрытых хитозаном и липидами НЧМ с 1 суток.

МНФ являются основными клетками в организме, которые осуществляют поглощение, метаболизирование и выведение НЧМ [Borm P. et al., 2006; Weissleder R. et al., 2014]. Положительная ИГХ реакция на маркеры клеток системы МНФ - CD68 (трансмембранный лизосомальный белок) и CD163 (рецептор для комплекса гаптоглобин-гемоглобин) - получена в печени (рис. 3А), легких, почках и селезенке крыс всех экспериментальных групп.

Количество CD68⁺ клеток в печени, легких и почках крыс во всех группах преобладает над CD163⁺, что связано с неспецифическим участием этой молекулы в осуществление эндоцитоза. Доминирование CD163⁺ клеток в селезенке крыс всех групп в течение эксперимента, в отличие от других органов, связано с активным участием её макрофагов в метаболизме гемового железа, об этом же свидетельствует расположение клеток, главным образом, в красной пульпе.

У животных после введения эмульсии полых липосом и раствора хитозана наблюдаются признаки активации фагоцитов (увеличение их количества, размеров и интенсивности окраски) [Allen T.M. et al., 1983, 1984], которые объясняются их участием в поглощении хитозана [Yuan Z.X. et al., 2011] и липидов [Марголис Л.Б. и др., 1986].

На 1 сутки у крыс после введения немодифицированных НЧМ, магнитных микросфер и магнитолипосом наблюдаются признаки активации макрофагов печени (рис.3А), селезенки и легких крыс. Последующее снижение количества МНФ объясняется их способностью к активному перемещению, которая позволяет им покидать регион фагоцитоза, внутриклеточному метаболизированию НЧМ, а также гибелью клеток [Gellissen J. et al., 1999; Briley-Saebo K. et al., 2004; Gu H.W. et al., 2005]. Увеличение количества иммунопозитивных МНФ в просвете воздухоносных путей и перидуктально в печени (7-21 сутки) после введения НЧМ и их модификаций демонстрирует

возможные пути элиминации НЧМ из организма крыс [Дзюман А.Н. и др., 2009], что полностью совпадает с результатами гистохимического исследования.

Нормализация количества, локализации и тинкториальных свойств МНФ изученных органов связана с выведением НЧМ из организма или их внутриклеточным преобразованием. Гидрофильные НЧМ, покрытые хитозаном, элиминируются быстрее, что обуславливает менее выраженные и непродолжительные изменения МНФ печени, легких, почек и селезенки крыс этой группы. Стабилизация НЧМ углеводами препятствует агрегации частиц и уменьшает влияние на клетки их агломератов [Глущенко Н.Н. и др., 2002]. Магнитолипосомы вызывают более существенную активацию МНФ по сравнению с модификацией НЧМ хитозаном, что объясняется присутствием в суспензии не покрытых липидами НЧМ.

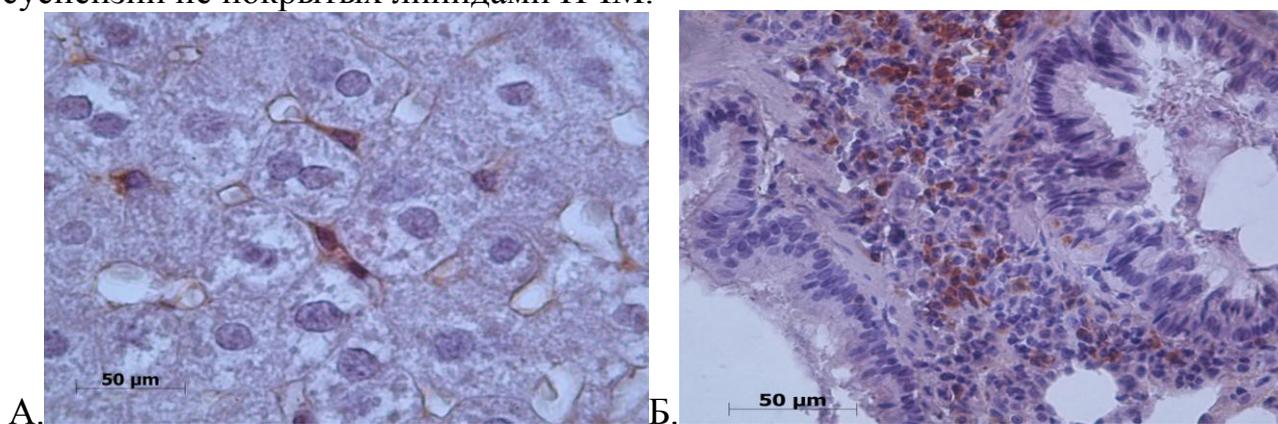


Рис.3. Печень, 1 сутки (А) и легкое, 14 сутки (Б) крысы после введения суспензии немодифицированных НЧМ. А. $CD68^+$ клетки, располагаются перисинусоидально. Б. $CD68^+$ клетки стромы легкого, лежащие перибронхиально ИГХ реакция на $CD68$ с докраской гематоксилином. А. Ув.1000. Б. Ув.400.

После введения суспензии немодифицированных НЧМ количество иммунопозитивных клеток в области триад нарастает с 7 по 14 сутки. В первые 7 дней эксперимента наблюдается увеличение количества $CD 68$ и $CD 163$ клеток в печени, относительно аналогичных показателей интактных крыс и их активация, что связано с поглощением НЧМ и их агломератов после предварительной опсонизации белками плазмы [Horisberger M., 1976; Бычкова А.В. и др., 2010].

В легких крыс клетки лежат перикапиллярно и соответствуют по морфологии МНФ, что позволяет отнести их к интерстициальным макрофагам. Перикапиллярное расположение макрофагов обеспечивает более эффективное поглощение ими НЧМ из сосудистого русла. Общей закономерностью реагирования МНФ легких крыс является рост количества иммунопозитивных клеток по сравнению с интактными животными, до 7 суток. Этот рост может быть обусловлен делением зрелых фагоцитов, миграцией и дифференцировкой молодых клеток, а также индукцией экспрессии маркеров в ходе активации гистиоцитов [Маянский Д.Н., 1981; Weissleder R. et al., 2014]. Увеличение количества иммуноположительных альвеолярных макрофагов на фоне снижения общего числа иммунопозитивных клеток иллюстрирует выведение НЧМ за счет миграции МНФ в просвет бронхиальных путей. После введения

немодифицированных НЧМ, а также покрытых хитозаном и липидами НЧМ иммунопозитивные клетки обоих ИГХ классов обнаруживаются в перибронхиальных инфильтратах, что хорошо согласуется с гистохимическими данными о локализации Перлс-позитивных клеток – рис.3Б.

Относительно слабое развитие системы МНФ в почках крыс подтверждается морфометрическими данными и невысоким уровнем её активации. Немодифицированные НЧМ (гидрофобные и агрегированные) выводятся почками незначительно и плохо проникают в их интерстиций, поэтому в отличие от модифицированных НЧМ не активируют CD68⁺ и 163⁺ клетки органа.

В печени крыс после введения суспензии покрытых хитозаном НЧМ рост количества иммуноположительных макрофагов в области триад наблюдается с 1 по 7 сутки, что характеризует большую интенсивность выведения покрытых хитозаном частиц по сравнению с немодифицированными НЧМ. Возрастание количества макрофагов обоих ИГХ классов, наблюдаемое в печени, нивелируется раньше, что также свидетельствует о более быстрой элиминации магнитных микросфер и совпадает с данными гистологического и гистохимического исследований [Nam H.Y. et al., 2009; Babadi V.Y. et al., 2012].

Более раннее и массовое появление иммунопозитивных клеток в альвеолах иллюстрирует ускорение выведения покрытых хитозаном НЧМ при посредничестве МНФ легких.

В почках крыс при введении модифицированных хитозаном НЧМ количество клеток обоих ИГХ классов выше, чем у интактных крыс в ранние сроки эксперимента (до 40 суток), что говорит о проникновении покрытых хитозаном НЧМ в интерстиций органа. Обнаружение признаков активации МНФ в строме почек можно объяснить небольшими размерами агломератов и высокой гидрофильностью модифицированных хитозаном НЧМ.

В печени крыс на фоне введения магнитолипосом иммунопозитивные клетки в области триад начинают накапливаться с 7 по 14 сутки, что совпадает с динамикой миграции фагоцитов у крыс, подвергшихся введению суспензии немодифицированных НЧМ. Отставание в выведении звездчатыми макрофагами НЧМ после введения магнитолипосом от элиминации покрытых хитозаном НЧМ можно объяснить присутствием в суспензии магнитолипосом некоторого количества немодифицированных НЧМ, бóльшим размером агломератов частиц и наличием у них оболочки, которая обеспечивает неспецифическую загрузку НЧМ в клетки и тем самым нарушает их функционирование [Kostarellos K. et al., 2007; Искусных И.Ю. и др., 2010].

Ультраструктурный анализ МНФ печени, легких и селезенки крыс после введения раствора хитозана и эмульсии полых липосом выявил активацию этих клеток с 1 по 14 сутки, что согласуется с данными иммуногистохимического метода. Признаками активации макрофагов на ультраструктурном уровне являются: увеличение размеров и изменение формы клетки, дифференцировка поверхности (рост числа псевдоподий) увеличение количества органелл аппарата внутриклеточного переваривания (гидролазные пузырьки, эндосомы,

лизосомы, остаточные тельца) [Karr Я, 1978; Allen T.M. et al., 1984; Wisse E., 1991]. Структура почек крыс двух упомянутых групп соответствует таковой у интактных животных.

Начиная с 1 суток, после введения суспензий непокрытых и модифицированных НЧМ в цитоплазме звездчатых макрофагов повсеместно выявляются везикулы от 0,2 до 1,5 мкм, содержащие НЧМ.

В звездчатых макрофагах после введения немодифицированных НЧМ и магнитолипосом преобладают везикулы, переполненные НЧМ, тогда как в аналогичных клетках крыс, подвергшихся введению покрытых хитозаном НЧМ, доминируют везикулы с умеренным количеством НЧМ – рис.4А.

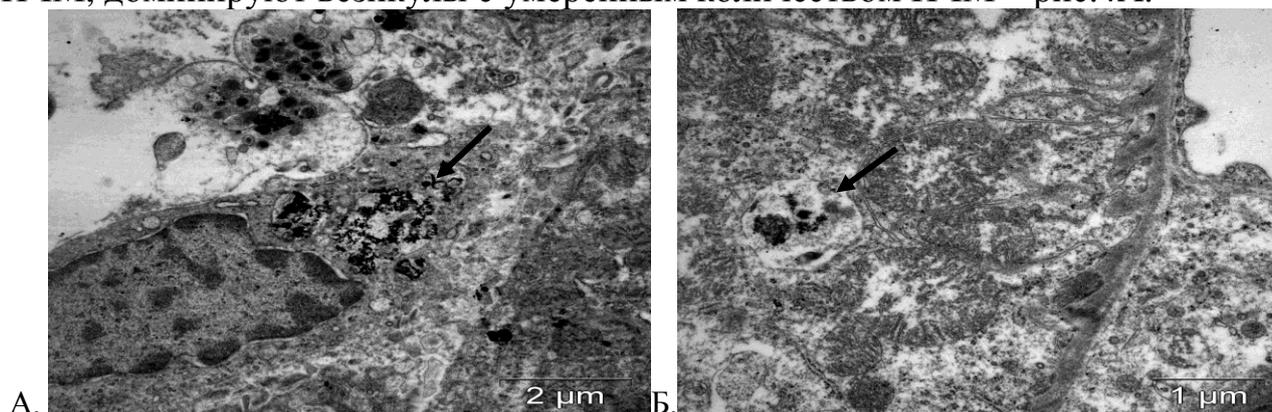


Рис.4. Печень (А) и почка (Б) крысы на 7 сутки после введения суспензии модифицированных хитозаном НЧМ. А. Фрагмент звездчатого макрофага, везикулы умеренно заполнены электронноплотными частицами. Б. Базальная часть нефроцита проксимального извитого канальца, содержащая везикулы с частицами размером 20-60 нм.

Часть везикул в звездчатых макрофагах располагается непосредственно под плазмолеммой, НЧМ в них прилегают к внутренней поверхности мембраны этих органелл. Размер этих фагосом значительно превышает размер везикул, расположенных в более глубоких слоях цитоплазмы и составляет 3-6 мкм – рис.5А.

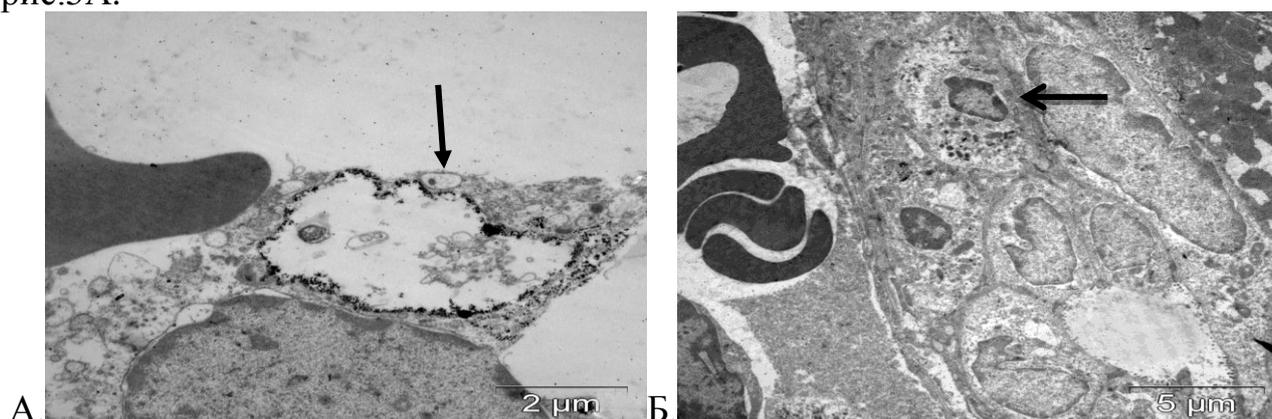


Рис.5. Печень крысы на 1 (А) и 14 (Б) сутки после введения суспензии немодифицированных НЧМ. А. Фрагмент звездчатого макрофага с субплазмолеммальной везикулой, окруженной мембраной. Везикула содержит электронноплотные частицы (60-90 нм), прилежащие к мембране. Б. Перидуктальное расположение звездчатых макрофагов в междольковой соединительной ткани области триады.

В МНФ печени, легких, селезенки и почек крыс после введения магнитолипосом с 1 суток выявляются везикулы двух типов: однослойные и многослойные (полиламеллярные), которые содержат НЧМ. Крупные везикулы (2-6 мкм) зачастую являются мультивезикулярными – рис.6А.

Следует отметить, что размер агрегатов НЧМ в эндосомах МНФ всех изученных органов определяется модификацией магнетита и составляет 20-60 нм в случае введения покрытых хитозаном НЧМ, 50-80 нм для агрегатов в составе магнитолипосом и 60-90 нм при введении немодифицированных НЧМ.

После введения немодифицированных НЧМ макрофаги, содержащие везикулы с их агрегатами, выявляются перидуктально с 14 суток, тогда как в случае введения покрытых хитозаном НЧМ, нагруженные магнетитом МНФ появляются в междольковой соединительной ткани уже с 7 суток, что хорошо соотносится с данными ИГХ исследования этих клеток.

После введения суспензий немодифицированных, покрытых хитозаном и липидами НЧМ в легких животных электронноплотные частицы выявляются исключительно в клетках системы МНФ, начиная с 1 суток. Зернистый материал располагается в цитоплазме интерстициальных и альвеолярных макрофагов в везикулах, окруженных биологической мембраной. Количество везикул и их плотность снижаются к концу эксперимента. В ранние сроки преобладают интерстициальные макрофаги, содержащие в цитоплазме везикулы с НЧМ, а с 21 суток – альвеолярные.

В почках крыс после введения суспензий немодифицированных НЧМ, магнитных микросфер и магнитолипосом НЧМ, начиная с 1 суток, определяются как в МНФ, так и в нефроцитах проксимальных и дистальных извитых канальцев – рис.4Б. Документированное перемещение везикул в нефроцитах проксимальных извитых канальцев от базального полюса к апикальному свидетельствует о переносе НЧМ трансцитозом из интерстиция в просвет извитых канальцев и характеризует способ выведения НЧМ путем канальцевой секреции, который подтверждается наличием на щёточной каёмке нефроцитов одиночных НЧМ и их агрегатов. Большая продолжительность периода выведения НЧМ почками у крыс после введения покрытых хитозаном НЧМ связана с меньшим размером частиц и свойствами их покрытия.

После введения суспензии магнитолипосом на основе НЧМ в нефроцитах проксимальных извитых канальцев нефронов крыс выявляются полиламеллярные везикулы (1-2 мкм) с зернистым материалом высокой электронной плотности. Везикулы содержат умеренное и незначительное количество агрегатов НЧМ размером 50-80 нм – рис.6Б.

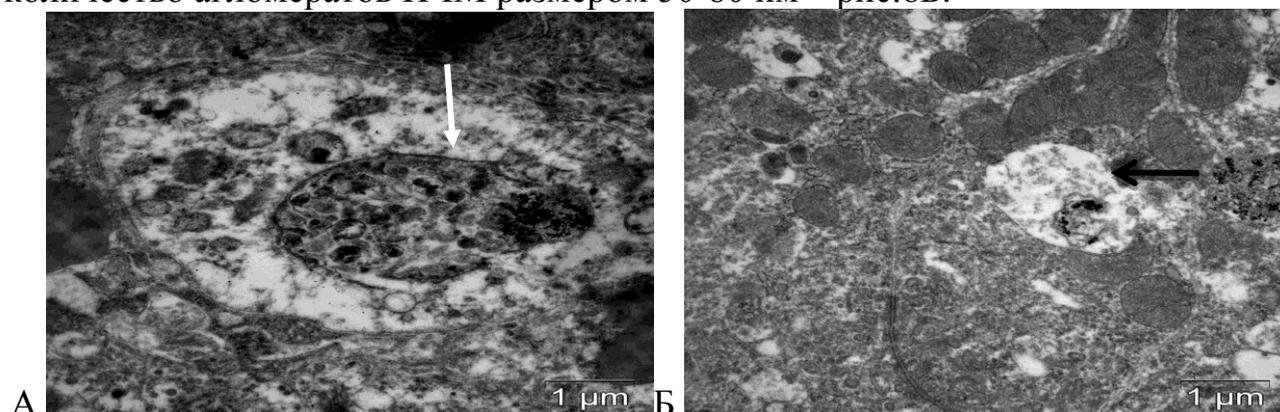


Рис.6. Печень (А) и почка (Б) крысы на 1 сутки после введения суспензии магнитолипосом на основе НЧМ.

А. Фрагмент цитоплазмы звездчатого макрофага, содержащий мультивезикулярные структуры с

электронноплотными частицами. Б. Фрагмент цитоплазмы нефроцита проксимального извитого канальца, содержащий полиламеллярную везикулу с зернистым материалом высокой электронной плотности.

После введения суспензий НЧМ в МНФ селезенки обнаруживаются везикулы, содержащие НЧМ. Подобные структуры выявляются, главным образом, в макрофагах красной пульпы.

Констатированное нами появление после введения суспензий немодифицированных, а также покрытых липидами и хитозаном НЧМ в органеллах аппарата внутриклеточного переваривания МНФ зернистого материала высокой электронной плотности и отсутствие подобных везикул в макрофагах крыс интактной группы однозначно свидетельствует о том, что в фагосомах находятся НЧМ. Кроме того, частицы, описанные в везикулах МНФ изученных нами органов, имеют размер, форму и электронную плотность, соответствующую НЧМ. Снижение плотности расположения НЧМ в везикулах и нарастание количества лизосом в МНФ в ходе эксперимента свидетельствует о возможности внутриклеточной биотрансформации частиц [Gellissen J. et al., 1999; Briley-Saebø K. et al., 2004]. Возможность метаболизирования НЧМ в фаголизосомах звездчатых макрофагов крыс показана в работе Vabadi V.Y. и соавт., причем активность преобразования зависит от содержания НЧМ в органеллах клетки. Интенсивное поступление и избыточное накопление НЧМ в клетке снижает эффективность интрализосомального преобразования НЧМ [Prabha S. et al., 2002; Vabadi V.Y. et al., 2012].

Наличие мембраны, локализация везикул в субплазмолеммальном слое цитоплазмы и расположение в них частиц исключительно субмембранно, свидетельствуют о поглощении НЧМ, вне зависимости от наличия или отсутствия модификации, механизмом рецептор-опосредованного эндоцитоза с формированием фагосом. Эндоцитозу НЧМ способствуют крупные размеры частиц и наличие линкеров-опсонинов [Zhang Y. et al., 2002; Кацнельсон Б.А. и др., 2010].

На протяжении эксперимента морфология везикул, содержащих НЧМ, в макрофагах закономерно изменяется. Сначала наблюдается компактизация НЧМ в везикулах, на более поздних сроках количество везикул в клетке и плотность расположения частиц в них снижаются, что характеризует уменьшение содержания НЧМ и иллюстрирует способность МНФ к их метаболизированию. К концу эксперимента встречаются макрофаги, в которых наряду с везикулами, содержащими НЧМ, определяются полые везикулы.

Преобладание в МНФ на 1 сутки везикул с компактным расположением НЧМ свидетельствует о том, что наиболее интенсивно поглощение частиц из кровеносного русла и удаление их из системной циркуляции происходит в первые 24 часа после инъекции.

Расположение МНФ с везикулами, содержащими большое количество компактно лежащих НЧМ перидуктально в печени и в альвеолах легких, свидетельствует о том, что для перегруженных НЧМ клеток оптимальным способом выведения магнетита является эвакуация за пределы органа. Миграция макрофагов с везикулами, содержащими НЧМ, через эпителий

междольковых жёлчных протоков в их просвет подтверждает возможность выведения НЧМ с жёлчью (рис.5Б).

В рамках предпринятого эксперимента ни в один из экспериментальных сроков не обнаружено НЧМ в клетках паренхимы печени и легких. Наблюдаемые нами в гепатоцитах зоны, лишенные органелл, нарушение структуры митохондрий (исчезновение крист, конденсация матрикса) и ЭПС (фрагментация), являются ультраструктурным проявлением дистрофии, документированной на гистологических препаратах печени соответствующих групп. Описанные нарушения ультраструктуры гепатоцитов могут быть связаны с непосредственным действием НЧМ на эти клетки (повреждение мембранных белков при взаимодействии с плазмолеммой) или опосредованно через гипоксию, стимуляцию свободнорадикальных процессов, факторы, выделяемые активированными МНФ и др [Decker K., 1990; Vallyathan V. et al, 1992].

Преобладание в МНФ печени при введении покрытого хитозаном магнетита везикул с умеренным количеством НЧМ связано с тем, что агрегаты частиц имеют меньший размер, чем в случае немодифицированных НЧМ и магнитолипосом, дольше циркулируют и менее активно поглощаются из сосудистого русла. Повреждение гепатоцитов после введения модифицированных хитозаном НЧМ не выражено в связи с более активным выведением этих частиц почками.

Быстрое снижение содержания НЧМ в лизосомах МНФ крыс, подвергшихся введению покрытых хитозаном НЧМ, свидетельствует о большей скорости метаболизма этих НЧМ по сравнению с немодифицированными частицами. Появление к 21 суткам звездчатых макрофагов, свободных от зернистого материала, характеризует завершение основных процессов выведения НЧМ.

Наличие многослойных везикул в МНФ крыс после введения магнитолипосом связано с их проникновением в клетки механизмом эндоцитоза или путем слияния их наружной оболочки с плазмолеммой. Так как большинство магнитолипосом суспензии являются полиламеллярными, появление мультивезикулярных фагосом может быть связано с объединением наружных мембран магнитолипосом или их слиянием с эндосомами. Обнаружение полиламеллярных структур в просвете синусоидов печени крыс, получавших суспензию магнитолипосом, обуславливает возможность их взаимодействия с гепатоцитами и объясняет бóльшую выраженность повреждений этих клеток, по сравнению с животными, которым вводили покрытые хитозаном НЧМ.

По содержанию железа органы интактных крыс располагаются в следующем порядке (по убыванию): селезенка, печень, легкие и почки. Содержание железа в исследованных органах животных интактной группы не изменяется на протяжении эксперимента.

Введение суспензии немодифицированных НЧМ сопровождается повышением содержания железа в печени, которое сохраняется, постепенно снижаясь, с 1 по 90 сутки. В легких и селезенке содержание железа превышает

соответствующие показатели животных интактной группы с 1 по 120 сутки. В почках животных увеличенное содержание железа наблюдается с 1 по 60 сутки.

Содержание железа в селезенке и почках животных после инъекции немодифицированных НЧМ снижается медленнее, чем у крыс после применения покрытых хитозаном НЧМ и магнитолипосом, так как агрегаты непокрытых частиц (самые крупные из используемых в работе), накапливаясь в клетках, требуют большего времени на внутрилизосомальное преобразование; увеличение времени пребывания немодифицированных НЧМ в клетках также возможно связано с нарушением функции МНФ при накоплении фагосом с НЧМ в цитоплазме.

Самое значительное повышение содержания железа, наблюдаемое в печени, легких и селезенке крыс через 1 сутки после введения суспензии немодифицированных НЧМ, связано с большим размером и гидрофобностью поверхности агрегатов этих частиц. Указанные свойства немодифицированных НЧМ способствуют их опсонизации и усиливают фагоцитоз.

Введение модифицированных хитозаном НЧМ сопровождается повышением содержания железа в печени и почках крыс с 1 по 40 сутки. В легких и селезенке крыс этой группы относительно интактных животных содержание железа повышено с 1 по 21 сутки.

Повышение содержания железа в печени, легких и селезенке крыс после введения покрытых хитозаном НЧМ выражено меньше, чем у животных, получавших немодифицированный магнетит, из-за пролонгированной циркуляции НЧМ, обеспечиваемой свойствами их покрытия [Weissleder R. et al., 1995; Moghimi S.M. et al., 2001]. Увеличение времени нахождения частиц в крови позволяет уменьшить их поглощение МНФ в первые часы после инъекции и реализовать иные механизмы выведения. Так, средний размер агрегатов частиц (30 нм) и гидрофильная поверхность позволяет покрытым хитозаном НЧМ выводиться через почки. Увеличение времени циркуляции НЧМ способствует постепенной эвакуации НЧМ и позволяет избежать быстрого чрезмерного накопления НЧМ в клетках и нарушения их функции, что способствует более эффективному метаболизированию НЧМ в лизосомах [Prabha S. et al., 2002]. Самое значительное повышение содержания железа из всех групп регистрируется в почках крыс после введения покрытых хитозаном НЧМ, что подтверждает большее значение почек в выведении магнитных микросфер, по сравнению с немодифицированными НЧМ и магнитолипосомами – рис.7.

Введение магнитолипосом на основе НЧМ сопровождается повышением содержания железа в печени, легких и селезенке животных относительно соответствующих показателей интактных крыс с 1 по 60 сутки. В почках крыс содержание железа повышено с 1 по 90 сутки.

Более выраженное повышение содержания железа в печени, легких и селезенке крыс после введения магнитолипосом, по сравнению с применением покрытых хитозаном НЧМ связано с присутствием в суспензии

магнитолипосом немодифицированных частиц, бóльшим средним размером магнитолипосом, а также возможностью дополнительного неспецифического проникновения этой модификации НЧМ в клетки, путем объединения мембран [Allen T.M. et al., 1983; Антипов С.А. и др., 2009].

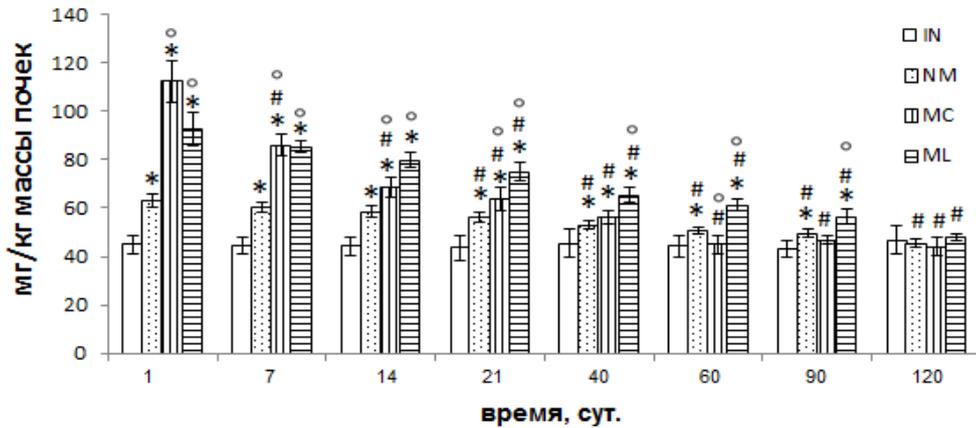


Рис.7. Динамика содержания железа в почках крыс экспериментальных групп, мг/кг_{массы почек}.

С целью установления метаболических изменений в клетках паренхимы печени, почек и сердца нами проведен комплекс гистоэнзимологических исследований гепатоцитов, кардиомиоцитов и нефроцитов крыс. Метаболический статус гепатоцитов, кардиомиоцитов и нефроцитов крыс после введения эмульсии полых липосом и раствора хитозана не изменяется в течение эксперимента.

Наибольшая выраженность и продолжительность изменений внутриклеточной активности ферментов наблюдается у крыс после введения немодифицированных НЧМ, затем следуют магнитолипосомы и магнитные микросферы, соответственно. Активность некоторых ферментов гепатоцитов (ЩФ), кардиомиоцитов (СДГ, ЛДГ, ГАФДГ, ГБДГ) и нефроцитов (Г-6-ФДГ) крыс после введения суспензии модифицированных хитозаном НЧМ не изменяется в течение эксперимента.

Выведение НЧМ из организма ведет к нормализации активности всех исследованных ферментов. Следует отметить, что после введения модифицированных хитозаном НЧМ и магнитолипосом активность ферментов возвращается к величинам, свойственным интактным животным, быстрее, чем после инъекции немодифицированных НЧМ, что связано с более эффективным их выведением из организма крыс. Так как немодифицированные НЧМ, магнитные микросферы и магнитолипосомы имеют разную скорость элиминации, то и время нормализации активности внутриклеточных ферментов в этих группах разное: чем медленнее частицы выводятся из организма и дольше сохраняются в нем, тем более длительное время активность ферментов гепатоцитов, кардиомиоцитов и нефроцитов крыс сохраняется измененной.

В гепатоцитах после введения суспензии немодифицированных НЧМ снижена активность СДГ, Г-6-ФДГ, ГлудГ и ГБДГ с 1 по 40 сутки, а ЩФ с 1 по 21 сутки, напротив, активность ГАФДГ (с 1 по 40 сутки) и ЛДГ (с 1 по 60 сутки) увеличена; в кардиомиоцитах активность ГАФДГ снижена до 7 суток,

ГБДГ повышена до 14 суток, СДГ и ЛДГ не изменяется. В нефроцитах проксимальных извитых канальцев крыс 4-ой группы повышена активность СДГ (с 1 по 40 сутки) и ЩФ (с 1 по 21 сутки), активность всех остальных ферментов снижена и нормализуется к 40 суткам.

После инъекции модифицированных хитозаном НЧМ в гепатоцитах активность ЛДГ и ГАФДГ повышена в течение 14 суток; СДГ и Г-6-ФДГ на протяжении 14 дней, ГлуДГ (на 1 сутки) и ГБДГ (с 1 по 7 сутки) снижена; активность ЩФ соответствует таковой у интактных крыс. В кардиомиоцитах животных этой группы активность изученных ферментов не отличается от аналогичных показателей интактных крыс. В нефроцитах животных наблюдается повышение активности СДГ, ЩФ и ГлуДГ в течение 14 суток, активность ЛДГ (до 21 суток), ГАФДГ (до 14 суток) и ГБДГ (1 сутки) снижена, активность Г-6-ФДГ соответствует таковой у интактных крыс.

Введение магнитолипосом вызывает в гепатоцитах снижение активности СДГ и Г-6-ФДГ до 21 суток, ЩФ и ГлуДГ до 14 суток, ГБДГ (до 7 суток) и увеличение активности ЛДГ и ГАФДГ до 21 суток. В кардиомиоцитах крыс 6-ой группы из определяемых ферментов повышается только активность ГБДГ (1 сутки). В нефроцитах крыс 6-ой группы возрастает активность СДГ (до 21 суток) и ЩФ (до 14 суток), активность остальных ферментов снижается, относительно показателей животных интактной группы и нормализуется в случае ЛДГ к 60 суткам, ГАФДГ к 40 суткам, ГлуДГ и ГБДГ к 14 суткам, Г-6-ФДГ к 7 суткам.

Снижение активности СДГ в гепатоцитах крыс после введения суспензий немодифицированных НЧМ, покрытых хитозаном НЧМ и магнитолипосом свидетельствует о влиянии НЧМ на энергетический метаболизм клетки, вызывая его смещение в сторону анаэробных реакций, что подтверждается сопутствующим увеличением активности ЛДГ и ГАФДГ в этих клетках. Подобные изменения могут быть объяснены развитием ишемии, возникающей вследствие дисциркуляторных изменений, наблюдаемых в этих органах. Кроме того, снижение активности СДГ гепатоцитов крыс, подвергшихся введению НЧМ, может быть связано с повреждением митохондрий, которое иллюстрируется данными электронной микроскопии. Повреждение митохондрий и изменение активности ферментов могут быть обусловлены косвенным воздействием на них свободных радикалов возникающих в ходе активации перекисного окисления НЧМ [Dick C.A. et al., 2003; Li N. et al., 2003], что подтверждено нашими исследованиями прооксидантных свойств НЧМ.

Снижение активности ЩФ в печени крыс связано с нарушением структуры гепатоцитов, которое приводит к уменьшению трансмембранного транспорта через их плазмолемму. Отсутствие изменений активности ЩФ гепатоцитов крыс после введения суспензии покрытых хитозаном НЧМ свидетельствует об интактности их мембраны и хорошо согласуется с результатами гистологического и ультраструктурного исследований печени этой группы.

Традиционно высокая активность ключевого фермента пентозофосфатного пути в гепатоцитах на фоне повреждения клеток печеночной паренхимы при введении немодифицированных и модифицированных НЧМ снижается. Гексозы в анаэробных условиях преимущественно направляются на гликолитический путь окисления. Кроме того, при повреждении клеток снижается их пролиферативная активность, что уменьшает потребление пентоз, необходимых для синтеза нуклеотидов [Плакунов В.К., 2001; Марри Р. и др., 2004]. Повреждением гепатоцитов можно объяснить угнетение и других важных метаболических путей клетки, а именно, обмена аминокислот и синтеза кетоновых тел на фоне снижения активности ГлуДГ и ГБДГ, соответственно.

Метаболические изменения кардиомиоцитов развиваются в результате дисциркуляторных расстройств в миокарде, документированных при гистологическом исследовании сердца крыс. В кардиомиоцитах крыс после введения суспензии немодифицированных НЧМ активность СДГ, с одной стороны, ЛДГ и ГАФДГ с другой - изменяются дискордантно, подобная реакция ферментов энергетического метаболизма свидетельствует о влиянии НЧМ на энергообеспечение миокарда. Смещение энергетического метаболизма в сторону аэробного окисления ведет к повышению эффективности использования субстратов [Зайцев С.Ю. и др., 2005]. Для ряда энергетических субстратов сердца, например, жирных кислот, вообще возможен только аэробный путь окисления [Марри Р. и др., 2004; Рогожин В.В., 2009]. Нормализация активности СДГ и ЛДГ объясняется выведением основного количества НЧМ и последующим восстановлением кровоснабжения органа. Увеличенная активность ГБДГ в кардиомиоцитах крыс связана с повышением роли кетоновых тел в обеспечении клеток энергией. У крыс после введения покрытых хитозаном НЧМ активность этого фермента не изменяется, что связано со свойствами модифицированных хитозаном НЧМ (небольшой размер, гидрофильность), которые оказывают минимальное, по сравнению с введением немодифицированных НЧМ и магнитолипосом, влияние на структуру и функцию клеток.

Метаболические изменения в кардиомиоцитах наблюдаются только после введения суспензии немодифицированных НЧМ, агломераты которых являются самыми крупными и наименее устойчивыми к агрегации. Указанные свойства частиц повышают вероятность формирования внутрисосудистых агломератов, эмболии ими сосудов микроциркуляторного русла, повреждения эндотелия и др., что в совокупности приводит к развитию ишемии.

На фоне введения наноматериала у животных активируются процессы клубочковой фильтрации и канальцевой секреции для обеспечения элиминации НЧМ из циркуляции. Усиление фильтрации и секреции неизбежно приводит к повышению потребности нефроцитов в энергии АТФ, которая обеспечивается активацией цикла трикарбоновых кислот [Северин Е.С. и др., 2006]. Повышение активности СДГ в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцах после введения суспензии НЧМ является проявлением адаптации эпителиоцитов к возросшей функциональной нагрузке и подтверждается

снижением в них активности ЛДГ и ГАФДГ. Самое значительное повышение СДГ в почках крыс после введения суспензии модифицированных хитозаном НЧМ связано с наибольшей интенсивностью трансцитоза НЧМ в нефроцитах этой группы, которая документирована при ультраструктурном исследовании почек. Высокая интенсивность трансцитоза в эпителиоцитах крыс этой группы обусловлена малыми средними размерами и гидрофильностью поверхности агломератов покрытых хитозаном НЧМ [L'Azou V. et al., 2008; Nam H.Y. et al., 2009].

На фоне усиления процессов фильтрации и секреции неизбежно происходит повышение интенсивности реабсорбции компонентов первичной мочи, это подтверждается увеличением активности ЩФ в нефроцитах крыс на фоне введения немодифицированных НЧМ, покрытых хитозаном НЧМ и магнитолипосом.

Усиление реабсорбции аминокислот приводит к интенсификации процессов трансаминирования, что проявляется ростом внутриклеточной активности ГлуДГ в нефроцитах проксимальных извитых канальцев. У животных после введения немодифицированных НЧМ и магнитолипосом активность ГлуДГ и Г-6-ФДГ снижается, так как в этих группах наблюдаются значительные повреждения (дистрофия и некроз) эпителиоцитов нефрона.

Изученные нами биохимические показатели плазмы крови (концентрация железа, церулоплазмينا, трансферрина, ферритина, свободная железосвязывающая способность, активность органоспецифичных ферментов, концентрация метаболитов, содержание свободных радикалов, общая антиоксидантная активность) животных интактной группы не изменяется на протяжении эксперимента. Введение эмульсии полых липосом и раствора хитозана не влияет на исследованные показатели плазмы крови крыс, которые соответствуют таковым у интактных животных в течение всего эксперимента.

Введение суспензии немодифицированных НЧМ вызывает увеличение относительно интактных крыс концентрации железа и ферритина в плазме крови, которое сохраняется в течение 120 суток. У животных этой группы пониженная с 1 по 90 сутки свободная железосвязывающая способность плазмы нормализуется к 120 суткам. Концентрация церулоплазмينا понижена с 1 по 60 сутки (достигая уровня, свойственного интактным животным к 90 суткам), а трансферрина в течение всего эксперимента.

У животных после введения покрытых хитозаном НЧМ повышенная концентрация железа и ферритина нормализуется к 90 и 120 суткам, соответственно. Концентрация церулоплазмينا и трансферрина после снижения с 1 по 21 сутки нивелируется к 40 суткам. Сниженная свободная железосвязывающая способность плазмы крови крыс нормализуется к 90 суткам.

Введение суспензии магнитолипосом на основе НЧМ вызывает увеличение относительно крыс 1-ой группы концентрации железа и ферритина с 1 по 90 сутки и с 1 по 120 сутки, соответственно. Концентрация церулоплазмينا

снижена с 1 по 40 сутки, трансферрина с 1 по 60 сутки, свободная железосвязывающая способность плазмы с 1 по 90 сутки.

Введение суспензий НЧМ сопровождается повышением концентрации плазменного железа, которое обеспечивается за счет перехода ионов с поверхности циркулирующих частиц или в ходе освобождения железа при преобразовании НЧМ в полости лизосом МНФ. Диссоциация частиц в крови является вполне обоснованной, так как НЧМ относятся к ультрадисперсным материалам, площадь удельной поверхности которых составляет $150 \text{ м}^2/\text{г}$.

Повышение концентрации железа в плазме у крыс после введения немодифицированных НЧМ связано в первую очередь с переходом ионов железа с непокрытой поверхности НЧМ в кровь. На более поздних сроках высокая концентрация плазменного железа, вероятно, поддерживается за счет внутрилизосомального преобразования НЧМ и экспорта ионов из клетки. Исследования Wisse E. и соавт. подтверждают возможность метаболизирования НЧМ в фагосомах звездчатых макрофагов [Prabha S. et al., 2002; Briley-Saebo K. et al., 2004; Vasir J.K. et al., 2007; Babadi V.Y. et al., 2012].

Сохранение повышенной концентрации железа в плазме крови крыс после введения суспензии немодифицированных НЧМ связано с накоплением и длительным пребыванием НЧМ в органеллах аппарата внутриклеточного переваривания клеток, а также крупными размерами их агрегатов.

Интенсивность диссоциации НЧМ снижается при нанесении на них покрытия, которое частично (модифицированные хитозаном НЧМ) или полностью (магнитолипосомы) изолируют поверхность НЧМ от взаимодействия с компонентами биологических жидкостей (ферментов, окислителей и др.) [Couvreur P. et al., 2002]. Наибольшее повышение концентрации железа в крови крыс после инъекции модифицированных хитозаном НЧМ связано с тем, что магнитные микросферы имеют наименьший размер, из используемых в работе НЧМ, и вследствие этого быстрее растворяются в кислом содержимом лизосом.

Магнитолипосомы вызывают минимальное изменение концентрации железа в плазме крови - наличие оболочки снижает интенсивность перехода атомов железа с поверхности НЧМ в плазму крови. Повышение концентрации железа в плазме крови крыс этой группы, скорее всего, происходит за счет внутрилизосомального преобразования НЧМ с последующим освобождением ионов железа [Gellissen J. et al., 1999; Briley-Saebo K. et al., 2004]. Кроме того, частицы в составе магнитолипосом организованы в крупные агрегаты, что по аналогии с немодифицированными НЧМ, вызывает увеличение времени их пребывания в клетках и сопровождается более продолжительным повышением концентрации железа.

На фоне введения суспензий НЧМ и их модификаций вследствие повышения концентрации железа в плазме крови крыс наблюдается закономерное снижение свободной железосвязывающей способности за счет насыщения трансферрина ионами железа из НЧМ. Самое значительное повышение концентрации плазменного железа после введения модифицированных

хитозаном НЧМ обуславливает максимальное снижение свободной железосвязывающей способности плазмы крови крыс этой группы. Подобное изменение данного параметра обеспечивает транспорт железа в плазме на фоне снижения концентрации трансферрина.

Наибольшее снижение свободной железосвязывающей способности плазмы наблюдается после введения частиц, покрытых хитозаном. Однако, самое длительное снижение этого параметра отмечается после введения немодифицированных НЧМ и магнитолипосом. Это связано с тем, что входящие в их состав агломераты крупнее, чем у покрытых хитозаном НЧМ и имеют более длительный период элиминации. Быстрая элиминация модифицированных хитозаном НЧМ подтверждается полной нормализацией свободной железосвязывающей способности плазмы крови к 90 суткам.

Самая низкая концентрация церулоплазмينا и трансферрина наблюдается на ранних сроках (1-7 сутки) в группе с введением суспензии немодифицированных НЧМ. В виду того, что церулоплазмин синтезируется только гепатоцитами, то его концентрация снижается при повреждении их структуры. Самое значительное нарушение структуры и функции гепатоцитов у крыс после введения суспензии немодифицированных НЧМ, подтвержденное гистологическими и гистоэнзимологическими данными, определяет самое выраженное и длительное снижение концентрации церулоплазмينا. Более ранняя нормализация структуры гепатоцитов после введения покрытых хитозаном НЧМ и магнитолипосом возвращает концентрацию этого белка к уровню, характерному для интактных крыс в более короткие сроки.

Причина снижения концентрации трансферрина после введения суспензий НЧМ представляется аналогичной той, которая наблюдается в случае церулоплазмينا. Трансферрин также синтезируется исключительно в печени и его концентрация в плазме будет снижаться при повреждении гепатоцитов.

Степень снижения концентрации церулоплазмينا/трансферрина и его продолжительность положительно коррелирует с выраженностью повреждений печени после введения различных суспензий НЧМ.

Высокие уровни плазменного железа стимулируют синтез ферритина в клетках, в частности, в гепатоцитах. В то же время, перегрузка гепатоцитов железом приводит к гепатотоксическому эффекту и повреждению этих клеток [Andrews N.C. et al., 2007]. Наблюдаемые повреждения (дистрофия и некроз) гепатоцитов, а также гибель резидентных макрофагов обеспечивают повышение концентрации ферритина в крови – рис.8. Свободное железо инициирует формирование активных форм кислорода и запускает перекисный тип повреждения клеток [Суханова Г.А. и др., 2000; Anderson G.J. et al., 2005], который вносит дополнительный вклад в повышение концентрации ферритина в плазме. Увеличение концентрации внутриклеточного белка - ферритина в плазме крови напрямую зависит от степени повреждения гепатоцитов. В виду самых обширных повреждений гепатоцитов обнаруженных нами у крыс, получавших немодифицированные НЧМ, наиболее выраженное и

продолжительное повышение концентрации плазменного ферритина наблюдается в этой группе.

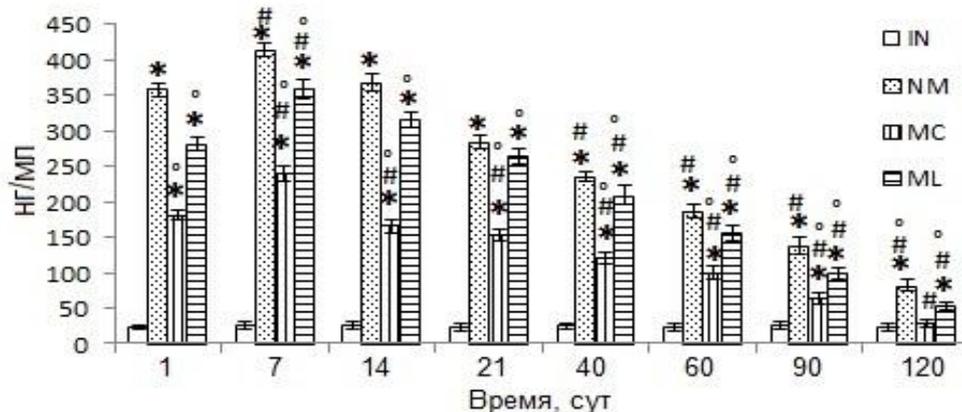


Рис.8. Динамика концентрации ферритина в плазме крови крыс экспериментальных групп, нг/мл.

Для установления влияния модифицированных НЧМ на функциональное состояние печени, сердца и почек крыс определяли активность некоторых органоспецифичных ферментов (АсАТ, АлАТ, ЩФ, γ -ГТ, КФК-МВ) и концентрацию метаболитов (мочевина, креатинин, мочевая кислота, общий и прямой билирубин) в плазме крови.

Максимальная активность всех изученных ферментов наблюдается на 1 сутки после инъекции суспензии НЧМ.

Внутривенное введение немодифицированных НЧМ провоцирует повышение активности ЩФ, достигающей уровня характерного для интактных крыс к 40 суткам, γ -ГТ, нормализующейся к 60 суткам, а также АлАТ, АсАТ и КФК-МВ, которые нивелируются к 90 суткам.

Инъекция модифицированных хитозаном НЧМ сопровождается увеличением активности ЩФ, которое нивелируется к 14 суткам, АлАТ, γ -ГТ и КФК-МВ, достигающие уровня характерного для интактных животных к 21 суткам, а также АсАТ, которая нормализуется к 40 суткам эксперимента.

Магнитолипосомы на основе НЧМ повышают активность АлАТ, АсАТ и КФК-МВ плазмы крови крыс, которые нормализуются к 60 суткам, а также ЩФ и γ -ГТ, которые достигают уровня свойственного интактным животным к 21 и 40 суткам, соответственно.

Повышение активности ЩФ в плазме крови животных после введения НЧМ, вероятно, является следствием повреждения гепатоцитов, нефроцитов, а также эпителия слизистой оболочки желчевыводящих путей [Jani P.U. et al., 1994]. Восстановление активности ЩФ после введения суспензий НЧМ и их модификаций, вероятно, связано с выведением НЧМ и восстановлением перечисленных выше эпителиоцитов. Наиболее быстро активность ЩФ нормализуется в плазме крови крыс подвергшихся введению покрытых хитозаном НЧМ, это объясняется тем, что инъекция данной модификации частиц сопровождается минимальным повреждением эпителиоцитов, а также высокой интенсивностью альтернативных механизмов выведения данной модификации магнетита (клубочковая фильтрация и канальцевая секреция).

Повышение активности АлАТ и АсАТ у крыс после введения суспензий НЧМ связано с повреждением паренхимы печени и/или миокарда. Нормализация активности аминотрансфераз в течение эксперимента совпадает с восстановлением структуры гепатоцитов и нормализацией гемодинамических расстройств в печени и сердце крыс.

Повышение активности γ -ГТ в плазме крови животных можно объяснить повреждением гепатоцитов, нефроцитов и нейронов, которое документировано (с различной степенью выраженности) при гистологическом исследовании печени и почек крыс после введения немодифицированных НЧМ, покрытых хитозаном НЧМ и магнитолипосом.

Вместе с другими кардиоспецифическими маркерами (например, АсАТ) повышение активности КФК-МВ свидетельствует о повреждении миокарда на фоне внутривенного введения НЧМ.

Введение немодифицированных НЧМ сопровождается повышением концентрации мочевины, креатинина, мочевой кислоты и общего билирубина в плазме крови крыс, которые нормализуются лишь к 120 суткам. Концентрация прямого билирубина снижена с 1 по 60 сутки и достигает показателей, характерных для интактных животных, к 90 суткам.

Инъекция суспензии модифицированных хитозаном НЧМ вызывает повышение концентрации мочевины, креатинина и общего билирубина, которое нивелируется к 40 суткам эксперимента. Повышение концентрации мочевой кислоты нормализуется к 60 суткам. Сниженная концентрация прямого билирубина достигает уровня, характерного для интактных крыс, к 14 суткам.

Введение суспензии магнитолипосом на основе НЧМ сопровождается возрастанием концентрации мочевины, которое нивелируется к 60 суткам; концентрации креатинина, мочевой кислоты и общего билирубина, которое достигает уровня, свойственного интактным крысам к 90 суткам. Концентрация прямого билирубина после кратковременного снижения нормализуется к 40 суткам.

Обнаруженное повышение концентрации общего билирубина в плазме крови крыс после введения суспензий НЧМ может быть связано с повреждением паренхимы печени, которое сопровождается снижением интенсивности его выведения и подтверждается снижением концентрации прямого билирубина; с активацией метаболизма МНФ, которая приводит к усилению синтеза предшественников билирубина; с нарушением его доставки в печень. Так, билирубин может вытесняться из связи с альбумином веществами, которые транспортируются альбуминами крови по конкурентному механизму, что снижает скорость образования прямого билирубина и выведения его из организма [Зайцев С.Ю. и др., 2005; Ткачук В.А., 2006; Рогожин В.В., 2009].

Вследствие повреждения гепатоциты не способны осуществлять синтез прямого билирубина, что обуславливает высокий уровень неконъюгированного билирубина плазмы [Карпищенко А.И., 2002].

Концентрация мочевины в плазме крови увеличивается при повышении потребления белков, а также при массивных внепеченочных деструктивных процессах, протекающих с преобладанием протеолиза [Рогожин В.В., 2009]. Увеличение концентрации мочевины в плазме крови крыс после введения суспензий НЧМ можно объяснить снижением мочевыделительной функции почек вследствие их повреждения, а также деструктивными изменениями в изученных нами органах (почка, печень), которые сопровождаются выраженным протеолизом.

Креатинин выводится в основном с мочой, его содержание в крови отражает фильтрационную способность почек [Зайцев С.Ю., 2005; Меньшиков В.В., 2002]. Повреждения почек на фоне введения суспензий НЧМ, сопровождаются снижением клиренса креатинина и увеличивает его концентрацию в плазме крови.

Повышение концентрации мочевой кислоты наблюдается при деструктивных процессах, сопровождающихся повреждением клеток и интенсивным распадом нуклеиновых кислот. Некротические и дистрофические процессы, наблюдающиеся во внутренних органах при введении суспензий НЧМ, неизбежно приводят к увеличению катаболизма нуклеиновых кислот.

Процессы выведения НЧМ протекают наиболее интенсивно в первую неделю после внутривенной инъекции, что объясняет наибольшие изменения активности ферментов и концентрации метаболитов плазмы крови на начальных сроках эксперимента [Moore A. et al., 2000; Thomas K. et al., 2005; Liu W.-T., 2006].

Результаты биохимического исследования плазмы крови хорошо согласуются с данными по изучению структуры печени, почек и сердца крыс после внутривенного введения суспензий немодифицированных НЧМ, магнитных микросфер и магнитолипосом.

Для оценки влияния НЧМ на свободнорадикальные процессы нами определено содержание свободных радикалов и состояние системы антиоксидантной защиты плазмы крови крыс после введения суспензий немодифицированных НЧМ, покрытых хитозаном НЧМ и магнитолипосом.

Введение суспензии немодифицированных НЧМ сопровождается повышением содержания свободных радикалов в плазме крови, которое нивелируется к 60 суткам. Общая антиоксидантная активность у животных этой группы сохраняется увеличенной в течение 60 суток и нормализуется к 120.

Введение модифицированных хитозаном НЧМ сопровождается ростом содержания свободных радикалов в плазме крови крыс в течение 14 суток. Общая антиоксидантная активность плазмы крови крыс этой группы повышена на протяжении 40 суток, после чего достигает уровня, характерного для интактных крыс.

Содержание свободных радикалов в плазме крови крыс после введения магнитолипосом на основе НЧМ увеличено в течение 14 суток. Затем после непродолжительного снижения описываемые параметры достигают уровня, характерного для интактных крыс. Общая антиоксидантная активность плазмы

крови крыс повышена относительно интактных крыс на протяжении 40 суток – рис.9.

НЧМ участвуют в генерации активных форм кислорода, вызывающих окислительный стресс и запускающих перекисное окисление биомолекул [Xia T. et al., 2006; Jones C.F. et al., 2009]. Существует несколько путей участия НЧМ в свободнорадикальных процессах: прямая генерация АФК с поверхности НЧМ, продукция АФК с помощью высвободившихся с поверхности НЧМ ионов железа, повреждение митохондрий, индукция клеточных сигнальных путей с последующей активацией воспалительного ответа, заключающегося в образовании активных радикалов кислорода и азота [Логинов А.С. и др., 1994; Li N. et al. 2003; Артемьева Ю.С. и др., 2005].

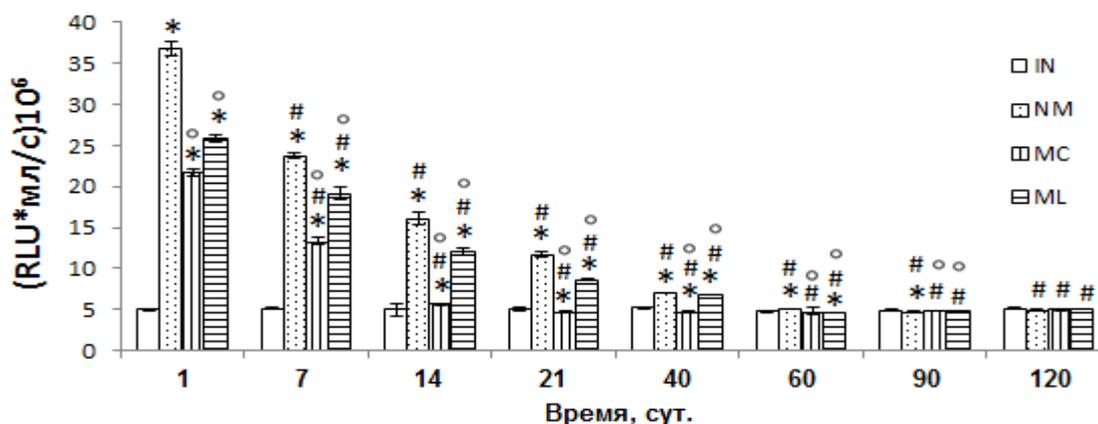


Рис.9. Динамика общей антиоксидантной активности плазмы крови крыс экспериментальных групп, (RLU*мл/с)10⁶.

Увеличение интенсивности хемилюминесценции плазмы крови крыс после введения суспензий НЧМ и их модификаций относительно аналогичных показателей плазмы крови животных интактной группы свидетельствует о повышении содержания в плазме крови свободных радикалов. Атомы железа, входящие в состав кристаллической решетки магнетита и находящиеся на поверхности НЧМ, переходят в раствор и в ионной форме способны инициировать образование активных форм кислорода в плазме [Суханова Г.А. и др., 2000]. Ввиду большой удельной поверхности НЧМ, можно предположить, что интенсивность обменных процессов ионами между твердой и жидкой фазой очень высока [Евстратова, К.И. и др., 1990; С.А. Dick et al. 2003].

Наибольшее влияние НЧМ на содержание радикалов в плазме крови прослеживается в группе с внутривенным введением суспензии немодифицированных НЧМ, что объясняется отсутствием покрытия, приводящего к пассивированию НЧМ. Модификация поверхности НЧМ хитозаном или липидами сопровождается резким снижением содержания свободных радикалов в плазме крови вследствие ограничения участия НЧМ в генерации свободных радикалов [Vallyathan V. et al., 1992]. Степень изоляции определяется типом покрытия: так, покрытие НЧМ липидными оболочками снижает их реакционную способность более значительно, нежели покрытие магнетита путем адсорбции хитозана.

Предварительные исследования общей антиоксидантной активности продемонстрировали дозозависимый прооксидантный эффект НЧМ: нарастание суммарной дозы магнетита при многократном введении суспензии немодифицированных НЧМ (каждые 2 дня в течение 40 суток животные внутривенно получали 2 мл суспензии - 7 мг(Fe₃O₄)/мл) сопровождается увеличением содержания свободных радикалов в плазме крови крыс.

Введение суспензий НЧМ и их модификаций вызывает повышение общей антиоксидантной активности плазмы крови в ранние сроки после инъекций, которая нормализуется по мере выведения НЧМ. Прослеживается прямая зависимость между временем выведения НЧМ и временем возвращения общей антиоксидантной активности плазмы к уровню, характерному для интактных крыс. Увеличение общей антиоксидантной активности плазмы крови после введения НЧМ подтверждает участие последних в активации её антиоксидантных систем.

Модификация НЧМ хитозаном вызывает меньшее увеличение общей антиоксидантной активности плазмы по сравнению с введением немодифицированных НЧМ, но превосходит аналогичный показатель плазмы крови крыс после инъекции магнитолипосом. Наиболее быстрая нормализация общей антиоксидантной активности плазмы крови наблюдается у крыс после введения покрытых хитозаном НЧМ и связана с самой большой скоростью элиминации этой модификации магнетита.

Менее выраженные изменения общей антиоксидантной активности плазмы крови у крыс после введения магнитолипосом связаны с тем, что частицы/агломераты частиц окружены билипидными слоями, которые изолируют магнетит от взаимодействия с кровью.

Таким образом, НЧМ обладают прооксидантными свойствами за счет входящего в их состав железа. Внутривенное введение НЧМ вызывает увеличение содержания свободных радикалов в плазме крови и сопровождается компенсаторной активацией её антиоксидантных систем.

Выводы

1. Модификация НЧМ хитозаном и липидами сопровождается снижением среднего размера их агломератов и повышает седиментационную устойчивость водно-солевой суспензии НЧМ по сравнению с немодифицированными частицами. Суспензия покрытых хитозаном НЧМ имеет меньший средний размер агломератов частиц, большую концентрацию и коллоидную устойчивость (32,5 нм, 4 мг(Fe)/мл, $\zeta=+50,4$ мВ), по сравнению с суспензией магнитолипосом на основе НЧМ (73 нм, 3,5 мг(Fe)/мл, $\zeta=+54$ мВ).

2. Покрытие хитозаном и липидами НЧМ снижает выраженность и продолжительность морфо-функциональных изменений печени, легких, почек, сердца, головного мозга, семенников и селезенки крыс после однократного внутривенного введения их суспензий в дозе 50 мг(Fe)/кг_{массы тела} по сравнению с немодифицированными НЧМ (50 мг(Fe)/кг_{массы тела}). Покрытые хитозаном НЧМ вызывают менее выраженные морфо-функциональные нарушения в изученных органах, чем магнитолипосомы.

3. Прижизненное распределение модифицированных хитозаном и липидами НЧМ после однократного внутривенного введения в дозе 50 мг(Fe)/кг_{массы тела} (по сравнению с немодифицированными НЧМ) показало снижение содержания обеих модификаций НЧМ в печени и легких, при увеличении их присутствия в почках крыс.

4. Однократное внутривенное введение модифицированных хитозаном НЧМ (50 мг(Fe)/кг_{массы тела}) сопровождается дисциркуляторными расстройствами в печени, легких, почках, сердце, головном мозге, селезенке и семенниках крыс, исчезающими к 40 суткам, а также сопровождается краткосрочными, нивелирующимися к 21 суткам, нарушениями метаболизма гепатоцитов и нефроцитов проксимальных извитых канальцев крыс.

5. Внутривенная инъекция суспензии магнитолипосом на основе НЧМ вызывает наряду с дисциркуляторными, дистрофические изменения в печени и гибель нейронов коры головного мозга крыс, которые устраняются к 40 суткам. В легких, почках, сердце, селезенке и семенниках животных наблюдается комплекс гемодинамических расстройств, более стойких (до 60 суток), чем после введения модифицированных хитозаном НЧМ. Кроме того, инъекция суспензии магнитолипосом вызывает более существенные и длительные изменения энергетического и пластического метаболизма гепатоцитов, нефроцитов и кардиомиоцитов крыс, которые устраняются к 40 суткам.

6. Однократное внутривенное введение суспензий модифицированных НЧМ в дозе 50 мг(Fe)/кг_{массы тела} сопровождается их поглощением МНФ селезенки, печени, легкого, почек и семенников крыс, а также ускорением выведения магнетита из организма крыс (по сравнению с немодифицированными НЧМ), что проявляется исчезновением НЧМ из фагосом МНФ изученных органов крыс, в случае введения покрытых хитозаном НЧМ к 90 суткам, магнитолипосом – к 120 суткам.

7. Внутривенное введение немодифицированных НЧМ сопровождается наиболее выраженным увеличением содержания железа в печени, легких, почках и селезенке и концентрации железа в плазме крови крыс, сохраняющихся в течение 120 суток. Покрытые хитозаном НЧМ вызывают менее продолжительные изменения содержания железа в органах (до 60 суток) и крови (до 90 суток) животных, по сравнению с магнитолипосомами (до 90 и 120 сутки, соответственно).

8. Инъекция суспензии немодифицированных НЧМ в дозе 50 мг(Fe)/кг_{массы тела} сопровождается самым значительным повышением концентрации железа и ферритина, а также снижением концентрации церулоплазмينا и трансферрина в плазме крови крыс, которые сохраняются в течение всего эксперимента. Инъекция суспензии модифицированных хитозаном НЧМ или магнитолипосом на основе НЧМ в той же дозе вызывает обратимые изменения метаболизма железа, которые менее выражены и краткосрочны (до 90 суток) после введения суспензии покрытых хитозаном НЧМ.

9. Модификация НЧМ хитозаном и липидами снижает их прооксидантные свойства и вызывает менее выраженную и более кратковременную активацию

антиоксидантных систем плазмы крови крыс, по сравнению с немодифицированными НЧМ. Модификация НЧМ с помощью липидов обеспечивает максимальное снижение прооксидантных свойств НЧМ и сопровождается минимальной активацией антиоксидантных систем плазмы крови.

Рекомендации

1. Использование НЧМ в биомедицинских исследованиях должно сопровождаться их предварительной стандартизацией, которая включает определение размера, структуры, дзетта-потенциала и концентрации наноматериала.

2. Стандартизацию дисперсий НЧМ для биологических и медицинских целей рекомендуется осуществлять комплексом следующих методов: трансмиссионная электронная микроскопия, рентгено-флуоресцентный метод, а также метод лазерной дифракции.

3. Для снижения выраженности и продолжительности повреждающего действия НЧМ на клетки, ткани и органы животного необходимо проводить поверхностную модификацию магнетита хитозаном или липидами.

4. Внутривенное введение модифицированных хитозаном НЧМ сопровождается менее выраженными морфо-функциональными изменениями внутренних органов крыс и увеличением скорости элиминации НЧМ из организма, чем инъекция магнитолипосом на основе НЧМ.

5. Модифицированные хитозаном и липидами НЧМ можно использовать как основу для создания современных терапевтических и диагностических средств, применение которых сопряжено с внутривенным введением и наличием магнитных свойств (целевая доставка лекарственных агентов, локальная управляемая гипертермия, МРТ).

Перспективы дальнейшей разработки темы

Создание эффективной системы целевой доставки лекарственных средств является одним из приоритетных направлений фармакологии и биотехнологии последнего десятилетия. Исследование биологических свойств модифицированных НЧМ позволяет определить оптимальные платформы для создания диагностических и терапевтических средств нового поколения. На основании результатов работы возможна разработка биосовместимых магнитоуправляемых носителей для целевой доставки лекарственных препаратов.

Изучение взаимодействия НЧМ с клетками, тканями и органами животных в эксперименте послужит теоретической основой для разработки отечественного универсального магнитоуправляемого носителя для систем целевой доставки лекарственных препаратов внешним постоянным магнитным полем на основе модифицированных суперпарамагнитных частиц. Дальнейшая доработка изученных наноконструкций позволит с их помощью переносить широкий круг лекарственных препаратов и существенно расширить спектр заболеваний, для лечения которых могут быть применены магнитоуправляемые носители на основе НЧМ. Применение систем целевой доставки лекарственных средств

значительно увеличит возможности и эффективность терапии существующих фармацевтических препаратов. Проведение научно-исследовательских работ по данному направлению будет способствовать переходу здравоохранения к современным эффективным методам лечения, что, несомненно, имеет огромное социальное значение. Разработка отечественного образца системы доставки лекарственных препаратов на основе магнитных наночастиц решает задачу импортного замещения в стратегически важных для страны областях здравоохранения, медицины и фармакологии.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. Метаболизм железа после введения крысам модифицированных наноразмерных частиц магнетита / И.В. Мильто, А.Ю. Гришанова, Т.К. Климентьева, И.В. Суходоло, Г.Ю. Васюков, В.В. Иванова // **Биохимия (1,021)**. – 2014. – № 11. – Т. 79. – С. 1527-1538.

2. Мильто, И.В. Макрофаги печени, легких, почек и селезенки крыс после внутривенного введения модифицированных наноразмерных частиц магнетита / И.В. Мильто // **Морфология (0,631)**. – 2014. – № 5. – Т. 146. – С. 40-45.

3. Изучение динамики CD68⁺ и CD163⁺ клеток внутренних органов крыс после внутривенного введения модифицированных хитозаном наночастиц магнетита / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, Г.Ю. Васюков, В.В. Иванова // **Морфология (0,631)**. – 2014. – №3. – Т. 145. – С. 128.

4. Возможности биомедицинского применения углеродных нанотрубок / И.В. Митрофанова, И.В. Мильто, Г.Ю. Васюков, И.В. Суходоло // **Бюллетень сибирской медицины (0,331)**. – 2014. – №1. – Т. 13. – С. 135-144.

5. Ультраструктура внутренних органов крыс после внутривенного введения модифицированных наночастиц магнетита и железа / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, Г.Ю. Васюков, В.В. Иванова, А.А. Меньших, И.В. Митрофанова, Л.В. Борисова // **Морфология (0,631)**. – 2013. – №5. – Т. 144. – С. 96.

6. Про- и антиоксидантная активность плазмы крови и гистология внутренних органов крыс после внутривенного введения наноразмерных частиц / И.В. Мильто, Т.К. Климентьева, И.В. Суходоло, Н.А. Кривова // **Биомедицинская химия (0,419)**. – 2013. – №3. – С. 330-338.

7. Гистохимическое исследование гепатоцитов, клеток почек и кардиомиоцитов крыс после внутривенного введения липидных комплексов железосодержащих наноразмерных частиц / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, Г.Ю. Васюков, А.А. Меньших, В.В. Иванова, И.В. Митрофанова // **Морфология (0,631)**. – 2012. – №3. – Т. 141. – С. 102-103.

8. Мильто, И.В. Биологические эффекты наноразмерного магнетита. Влияние наноразмерных частиц магнетита на морфо-функциональное состояние внутренних органов крыс / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, Т.К. Климентьева. - Saarbrücken, Germany: Lambert Academic Publishing, 2011. - 162 с., с ил.

9. Влияние наноразмерного магнетита на сократительную активность гладкомышечных сегментов легочной артерии морских свинок / А.В. Носарев,

Е.Е. Абраменко, Л.В. Капилевич, В.Н. Васильев, Е.Ю. Дьякова, А.М. Табаева, И.В. Мильто, Т.А. Кироненко, В.В. Перфильева // **Бюллетень сибирской медицины (0,331)**. – 2012. – №1. – Т. 11. – С. 52-58.

10. Морфо-функциональные последствия внутривенного введения наноразмерного магнетита в эксперименте / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, Т.К. Климентьева, А.А. Магаева // 2-я Международная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина». 2011. – С. 41.

11. Мильто, И.В. Структура печени, легкого, почек, сердца и селезенки крыс после многократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита / И.В. Мильто, И.В. Суходоло // **Вестник РАМН (0,641)**. – 2012. – №3. – С. 75-79.

12. Мильто, И.В. Структурные изменения некоторых органов крыс после однократного внутривенного введения наноразмерного магнетита / И.В. Мильто, И.В. Суходоло // **Морфология (0,631)**. – 2012. – № 2. – Т. 141. – С. 49-53.

13. Мильто, И.В. Ультраструктура печени крыс после многократного внутривенного введения наноразмерного магнетита / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, А.А. Миллер // **Вестник ВолГМУ (0,139)**. – 2011. – №3. - Т. 39. – С. 92-94.

14. Мильто, И.В. Мононуклеарные фагоциты печени и легкого крысы после внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, В.Ю. Усов // **Цитология (0,476)**. – 2012. – №7. – Т. 54. – С. 566-572.

15. Мильто, И.В. Электронно-микроскопическое исследование печени крыс после внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, А.А. Миллер // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины (0,408)**. – 2012. – №4. – Т. 153. – С. 510-513.

16. Мильто, И.В. Отдаленные последствия однократного внутривенного введения наноразмерного магнетита в эксперименте / И.В. Мильто, И.В. Суходоло // **Морфология (0,631)**. – 2011. – №5. – Т. 140. – С. 100.

17. Гистоэнзимологическое исследование клеток паренхимы печени и почек крыс после внутривенного введения наноразмерного магнетита / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, Т.К. Климентьева, Н.М. Шевцова // **Бюллетень сибирской медицины (0,331)**. – 2011. – №3. – Т. 10. – С. 48-53.

18. Мильто, И.В. Взаимодействие наноразмерных частиц с организмом в эксперименте / И.В. Мильто // «Опто-, наноэлектроника, нанотехнологии и микросистемы»: труды международной конференции. – Ульяновск: изд-во УГУ, 2011. – С. 185-186.

19. Мильто, И.В. Ультраструктурная характеристика паренхимы и стромы печени при воздействии наноматериалов / И.В. Мильто, И.В. Суходоло // Сборник научных трудов VIII Всероссийской конференции по патологии клетки. – Москва: изд-во МДВ, 2010. – С. 248-251.

20. Мильто, И.В. Структура печени, легкого и почек крыс при внутривенном введении магнитолипосом / И.В. Мильто, А.Н. Дзюман // **Морфология (0,631)**. – 2009. – № 3. – С. 63-66.

Список использованных сокращений

АлАТ – аланинаминотрансфераза
 АсАТ – аспартатаминотрансфераза
 АФК – активные формы кислорода
 Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
 ГАФДГ – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа
 ГБДГ – 3-гидроксибутиратдегидрогеназа
 ГлудГ - глутаматдегидрогеназа
 ГЭБ – гемато-энцефалический барьер
 ГЭПЭС – 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфониевая кислота
 ИГХ – иммуногистохимия
 КФК-МВ – креатинфосфокиназа МВ
 ЛДГ – лактатдегидрогеназа
 МНФ – мононуклеарные фагоциты
 МРТ – магнитно-резонансная томография
 НЧМ – наноразмерные частицы магнетита
 СДГ – сукцинатдегидрогеназа
 ЩФ – щелочная фосфатаза
 ЭПР (ЭПС) – эндоплазматический ретикулум (сеть)
 γ -ГТ – γ -глутамилтрансфераза

Автор выражает глубокую признательность за помощь в выполнении настоящего исследования ведущему инженеру ЦКП «Нанотех» ИФПМ СО РАН, канд. физ.-мат. наук Миллеру А.А., руководителю отделения рентгеновских и томографических методов диагностики ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН, д-ру мед. наук Усову В.Ю., зав. лабораторией экспериментальной биологии ОСП НИИ ББ НИ ТГУ д-ру биол. наук Кривовой Н.А., стар. науч. сотруднику лаборатории экспериментальной биологии ОСП НИИ ББ НИ ТГУ, канд. биол. наук О.Б. Заевой, зав. клинико-диагностической лаборатории медицинского центра №1 КБ №81 ФМБА РФ Барановой И.А., врачу клинико-диагностической лаборатории медицинского центра №1 КБ №81 ФМБА РФ Масловой О.С., главному научному сотруднику лаборатории нейрогуморальной регуляции ФГБУ НИИ фундаментальной медицины и физиологии СО РАМН, д-ру мед. наук В.Ф. Максимову, инженеру лаборатории нейрогуморальной регуляции ФГБУ НИИ фундаментальной медицины и физиологии СО РАМН В.Г. Розину, ведущему научному сотруднику ОСМ ТНЦ СО РАН, канд. физ.-мат. наук Итину В.И., старшему научному сотруднику ОСМ ТНЦ СО РАН, канд. хим. наук Магаевой А.А., старшему научному сотруднику ОСМ ТНЦ СО РАН, канд. тех. наук Тереховой О.Г., аспирантам кафедры морфологии и общей патологии Гутору С.С., Васюкову Г.Ю. и Ивановой В.В.

Подписано в печать 29.12.2014 г.
Усл. печ. листов 2. Печать на ризографе.
Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ
634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел. 53-04-08

Заказ № 75. Тираж 100 экземпляров.