

На правах рукописи

**Васюков Георгий Юрьевич**

Морфо-функциональное состояние органов и тканей крыс после  
внутривенного введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом  
наночастиц железа

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Томск – 2015

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

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук, доцент

Мильто Иван Васильевич

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
старший научный сотрудник  
отделения патологической анатомии  
и цитологии, ФГБНУ «Томский  
научно-исследовательский институт  
онкологии»

Савельева Ольга Евгеньевна

кандидат медицинских наук,  
старший научный сотрудник лаборатории  
лекарственной токсикологии, ФГБНУ  
«НИИ фармакологии и регенеративной  
медицины имени Е.Д. Гольдберга»

Фомина Татьяна Ивановна

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук» (г. Екатеринбург)

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 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](http://www.ssmu.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Александр Владимирович Герасимов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Одним из приоритетных направлений развития медицины является разработка и внедрение новых методов диагностики и терапии заболеваний. Появление у вещества в наносостоянии новых физических, химических и биологических свойств позволяет создавать материалы с уникальными механическими, оптическими и электрическими характеристиками, что открывает перспективы для их использования в медицине и биологии [Gleiter H., 1991; Губин С.П. и др., 2005]. Наноматериалы, обладающие магнитными свойствами, например, железо и его оксиды являются перспективными платформами для разработки новых лекарственных и диагностических средств [Левитин Е.Я. и др., 1998; Кузнецов В.Д. и др. 2005; Nikiforov V.N., 2009]. Постоянно разрабатываются новые технологии синтеза наноматериалов, которые позволяют создавать наноструктуры с заданным комплексом свойств для решения конкретных биомедицинских задач [Gleiter H., 1991; Губин С.П. и др., 2005].

Однако, широкому внедрению наноматериалов в медицинскую практику должно предшествовать детальное изучение их физико-химических свойств и биологических эффектов. Неспецифическое взаимодействие с клетками, склонность к кумуляции, низкая скорость элиминации и коллоидная устойчивость, накопление вне органов-мишеней, а также токсичность -являются главными недостатками немодифицированных магнитных наночастиц, в том числе и наночастиц железа [Бруснецов Н.А., 1996; Shen L. et al., 1999; Berry C. et al., 2003; Сазонов А.Э. и др., 2006; Worm P.J. et al., 2006; Мильто И.В. и др., 2008]. Решением этой проблемы могут послужить разные варианты модификации поверхности наночастиц. Все покрытия, наносимые на наноразмерные материалы можно разделить на органические (липиды, полисахариды, полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливинилэтанол, гепарин, высшие карбоновые кислоты), неорганические (графен, благородные металлы) и смешанные (аминосиланы) [Меньшикова В.В., 2002]. Применение покрытий позволяет повысить коллоидную устойчивость водных суспензии наночастиц, снизить токсичность, увеличить их биодоступность и биосовместимость.

Изучение взаимодействия магнитных наноразмерных частиц и наноконструкций на их основе с организмом является необходимым этапом разработки их биомедицинских приложений, а также обязательным условием создания терапевтических средств нового поколения [Papisov M.I. et al., 1993; Petri-Fink A. et al., 2005; Aggarwal P. et al., 2009].

Перспективным и требующим детального изучения наноматериалом являются покрытые углеродом наночастицы железа. Углеродное покрытие предотвращает окисление железа, что в свою очередь позволяет сохранять у них более выраженные магнитные свойства (магнитный момент и др.)

Вследствие того, что свободнорадикальные реакции являются одним из главных повреждающих факторов немодифицированных магнитных наноматериалов, покрытие железосодержащих наночастиц углеродом, позволяет в значительной степени снизить их токсические эффекты [Vallyathan

V. et al., 1992; Li N. et al., 2003; Антипов С.А. и др., 2010]. Более того, покрытая углеродом поверхность представляет из себя удобную платформу для прикрепления веществ различного химического строения, что является важным фактором в сфере целевой доставки лекарственных веществ. Следует отметить, что одной из проблем применения магнитных наночастиц в медицине и биологии является их низкая коллоидная устойчивость. В настоящее время широкое применение с целью повышения агрегативной и седиментационной устойчивости нашли мицеллярные структуры на основе амфифильных молекул [Vacri J.C. et al., 1990; Fabre P. et al., 1990; Calderon F.L. et al., 1994; Vacri J.C. et al., 1996; V. Verejnov et al., 1998]. В качестве гидрофильного компонента мицеллы с целью повышения биосовместимости, а также времени циркуляции в кровеносном русле, наиболее широко применяют ПЭГ и его производные [Gaucher G. et al., 2005].

**Степень разработанности темы исследования.** На данный момент имеется достаточно мало информации о способах стабилизации покрытых углеродом наночастиц железа, которые повышают их биосовместимость. Практически отсутствуют данные об особенностях влияния покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе на организменном уровне, их фармакокинетики и фармакодинамики (неоднозначно определены органы-мишени и вызываемые в них морфо-функциональные изменения, а также ответные реакции организма). Большинство работ по изучению биологических эффектов модифицированных наночастиц железа и наноконструкций на их основе осуществляются в условиях *in vitro* (влияние на отдельные биомолекулы, ферменты или клеточных популяции).

**Цель исследования:** изучить структуру и функциональное состояние внутренних органов крыс после однократного и многократного внутривенного введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа.

**Задачи исследования:**

1. Приготовить водно-солевую суспензию магнитомицелл на основе покрытых углеродом наноразмерных частиц железа для внутривенного введения и провести её стандартизацию.

2. Изучить морфологические изменения в печени, легких, почках, сердце и селезенке крыс после однократного (в дозах 6 и 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>) и многократного (от 24 до 120 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>) внутривенного введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа.

3. Охарактеризовать в динамике функциональное состояние печени, почек и сердца крыс после однократного (в дозах 6 и 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>), а также многократного (от 24 до 120 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>) внутривенного введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа.

4. Выявить влияние магнитомицелл на основе покрытых углеродом наноразмерных частиц железа после однократного (в дозах 6 и 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>) и многократного (от 24 до 120 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>) введения на структуру эритроцитов крыс.

5. Сравнить биологические эффекты покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе после однократного (в дозах 6 и 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>) и многократного (от 24 до 120 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>) введения.

**Научная новизна.** Впервые исследовано комплексное влияние магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа на морфо-функциональное состояние органов крыс после однократного и многократного внутривенного введения их суспензии в различных концентрациях в динамике. Выявлен ряд структурных и биохимических изменений печени, легких, почек, сердца и селезенки крыс, обусловленных внутривенным введением магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа. Продемонстрировано накопление магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа в мононуклеарных фагоцитах (МНФ) печени, селезенки, легких и почек крыс. Впервые показано, что внутривенное введение магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа вызывает ряд дисциркуляторных расстройств в печени, легких, почках, сердце и селезенке, а также моноцеллюлярные (фокальные) некрозы в печени и почках крыс. Впервые проведен ультраструктурный анализ печени и легких крыс после одно- и многократного внутривенного введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа в разных дозах. Продемонстрировано влияние магнитомицелл на основе модифицированных наночастиц железа на структуру эритроцитов крыс после однократного и многократного внутривенного введения. Выявлено изменение активности органоспецифических ферментов и концентрации метаболитов плазмы крови крыс после одно- и многократного внутривенного введения суспензии магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа. Впервые установлено изменение активности внутриклеточных ферментов гепатоцитов, кардиомиоцитов и нефроцитов проксимальных извитых канальцев после однократного и многократного внутривенного введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа. Продемонстрировано отсутствие выраженных изменений в отдаленные сроки (60, 90 и 120 сутки) после однократной внутривенной инъекции магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа. Показана зависимость выраженности морфологических и биохимических изменений в организме крыс от дозы магнитомицелл на основе покрытых углеродом наноразмерных частиц железа.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В ходе проведенной работы получены новые данные фундаментального характера, раскрывающие морфо-функциональные особенности взаимодействия магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа с тканями и органами крыс. Полученные результаты дополняют имеющиеся знания о биологических эффектах поверхностно модифицированных наноматериалов.

Отсутствие гибели животных и характер структурных и метаболических изменений в клетках и внутренних органах крыс, указывают на их обратимость. Продемонстрировано развитие комплекса компенсаторно-приспособительных реакций после внутривенного введения магнитомицелл на основе покрытых

углеродом наночастиц железа. Полученные данные указывают на принципиальную возможность использования магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа для решения биомедицинских задач в области адресной доставки, магнитной гипертермии и МРТ диагностики. Основываясь на полученных данных о фармакокинетике и фармакодинамике магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа, возможна разработка стратегии по их использованию в терапевтических и диагностических целях.

**Методология и методы исследования.** Дизайн эксперимента и набор используемых в работе методов позволяет получить достоверную информацию о влиянии магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа на структуру и функциональное состояние внутренних органов крыс. Достаточное количество животных дает возможность провести обобщение полученных экспериментальных данных, сформировать представления об основных типах патологических процессов, возникающих после введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа выявить органы-мишени, оценить компенсаторно-приспособительные реакции организма крыс. В работе использован комплекс современных и традиционных морфологических и биохимических методов, которые способствуют получению достоверной информации о биологических эффектах магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа на организм в эксперименте.

**Положения выносимые на защиту:**

1. Модификация покрытых углеродом наночастиц железа с помощью DSPE-PEG-2000 повышает коллоидную устойчивость их водной суспензии.

2. Однократное и многократное внутривенное введение магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа приводит к их поглощению и накоплению мононуклеарными фагоцитами печени, легких, селезенки и почек крыс.

3. Однократное и многократное внутривенное введение магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа вызывает морфологические изменения в печени, легких, почках, селезенке и сердце крыс, а также сопровождается увеличением количества патологических форм эритроцитов.

4. Однократное и многократное внутривенное введение магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа приводит к изменению активности внутриклеточных ферментов печени, почек и сердца крыс, а также активности ряда органоспецифичных ферментов и концентрации метаболитов плазмы крови.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Высокая степень достоверности полученных результатов обеспечивается использованием комплекса современных и традиционных методик, достаточным объемом экспериментального материала (210 крыс) и адекватными подходами к статистической обработке количественных данных.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на Втором конкурсе молодых ученых «Наука – практике 2012» (г. Кемерово, 2012); 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); 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 14 работ, из них 4 полнотекстовых статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Диссертация изложена на 311 страницах машинописного текста, состоит из введения, основной части (глав «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты собственных исследований» «Обсуждение результатов собственных исследований»), заключения, списка использованных сокращений и списка литературы. Библиографический указатель работы включает 371 источник, из которых 88 отечественных и 283 зарубежных. Работа иллюстрирована 73 рисунками и 25 таблицами.

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

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на 210 беспородных половозрелых крысах-самцах, массой  $180 \pm 30$  г, из которых были сформированы 7 групп: 1-я группа (40 крыс) – интактные животные; 2-я группа (40 крыс) – однократное внутривенное введение стабилизированной суспензии покрытых углеродом наночастиц железа в дозе  $6 \text{ мг(Fe)/кг}_{(\text{массы тела})}$ ; 3-я группа (40 крыс) – однократное внутривенное введение стабилизированной суспензии магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа в дозе  $6 \text{ мг(Fe)/кг}_{(\text{массы тела})}$ ; 4-я группа (25 крыс) – однократное внутривенное введение стабилизированной суспензии покрытых углеродом наночастиц железа в дозе  $60 \text{ мг(Fe)/кг}_{(\text{массы тела})}$ ; 5-я группа (25 крыс) – однократное внутривенное введение стабилизированной суспензии магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа в дозе  $60 \text{ мг(Fe)/кг}_{(\text{массы тела})}$ ; 6-я – группа (20 крыс) многократное внутривенное введение (каждые 2 суток) стабилизированной суспензии покрытых углеродом наночастиц железа с дозой однократной инъекции  $6 \text{ мг(Fe)/кг}_{(\text{массы тела})}$ ; 7-я группа (20 крыс) многократное внутривенное введение (каждые 2 суток) стабилизированной суспензии магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа с дозой однократного введения  $6 \text{ мг(Fe)/кг}_{(\text{массы тела})}$ . Объем наносуспензии для однократного внутривенного введения составлял 2 мл.

Содержание животных и работа с ними проводились согласно требований «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1987г) и Федерального Закона РФ «О защите животных

от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. Внутривенное введение суспензий проводили в одну из хвостовых вен, с предварительным обездвиживанием животного в фиксаторе Когана [Горбунова Н. А., 1998].

Выведение животных из эксперимента проводили методом асфиксии углекислым газом [Левитин Е.Я. и др., 1998] через 1, 7, 14, 21, 40, 60, 90 и 120 суток в 1-й, 2-й и 3-й группах и через 1, 7, 14, 21, 40 суток в 4-й, 5-й, 6-й и 7-й группах после инъекции. Взятие материала у животных всех групп производили в одни и те же сроки. За 24 часа до выведения крыс из эксперимента производили пищевую депривацию при сохранении свободного доступа животных к воде.

Для исследования брали печень, почки, лёгкие, сердце (левый желудочек), селезенку и кровь крыс.

Покрытые углеродом наноразмерные частицы железа получены газофазным методом в Лаборатории прикладного магнетизма Института физики металлов УО РАН (г. Екатеринбург), имеют сферическую форму и средний размер частиц 10 нм. Углеродная оболочка толщиной не более 2 нм, окружает частицу и состоит из нескольких графеновых слоев, расстояние между которыми составляет 0,34 нм. Между наночастицами имеется аморфный углерод, на который приходится не более 3%. Площадь удельной поверхности покрытых углеродом наночастиц железа составляет  $55 \pm 3$  м<sup>2</sup>/г.

Методы исследования:

1. Приготовление суспензий покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе для внутривенного введения. Навеску покрытых углеродом наночастиц железа (0,8 г и 3 г) растворяли в физиологическом растворе (Вирион, Россия), после чего полученные суспензии подвергали сонификации (20кГц) в течение 20 мин на ультразвуковом дезинтеграторе Bandelin Sonopuls HD2070 (Bandelin, Германия). Для приготовления суспензий магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа в суспензии наночастиц добавляли 1,2-дистеароил-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] аммониевую соль DSPE-PEG-2000 (Avanti Polar Lipids, Inc., США) и снова подвергали дезинтеграции в течение 15 мин. Весовое соотношение покрытые углеродом наночастицы железа/DSPE-PEG-2000 равнялось 0,5.

2. Концентрацию железа в суспензиях определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии на спектрометре iCAP 6300 Duo (Thermo Scientific, США).

3. Распределение частиц по размерам устанавливали методом динамического светорассеяния с помощью лазерного анализатора размерности Zetasizer nano zs (Malvern Instruments, Великобритания).

4. Томографическое исследование внутренних органов крыс проводили на МРТ-сканере Toshiba Titane (Toshiba America Medical Systems, Inc., США) с индукцией поля 1,5Т. МРТ крысам проводили на 1, 40, 90 и 120 сутки после введения суспензии покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе. МРТ проводилась в продольных (фронтальных) и поперечных (аксиальных) плоскостях в T1(спин-решетчатом)- и T2(спин-спиновом) -

взвешенном режиме, с охватом всего тела животного. Для областей соответствующих расположению печени, легких и почек рассчитывалась интенсивность T2-взвешенного изображения в аппаратных единицах, используемых для МР-томографов Toshiba Medical.

5. Гистологические и гистохимические методы исследования исследуемых органов. Печень, легкие, почки, сердце и селезенку фиксировали в забуференном 10% формалине рН 7,4 (Биовитрум, Россия) в течение 24 ч при 4°C, обезвоживали в изопропанолe (Биовитрум, Россия) в течение 30 ч и заливали в парафиновую смесь HistoMix (Биовитрум, Россия). Из парафиновых блоков на полуавтоматическом микротоме (МЗП 01 – Техном, Россия) изготавливали срезы толщиной 5 мкм и монтировали их на предметные стекла [Меркулов Г.А., 1972; Саркисов В.М., 2002].

6. С целью обнаружения в тканях ионов Fe(III) использовали метод Перлса, после чего докрашивали гематоксилином и эозином (Биовитрум, Россия) [Пирс Э., 1962]. Микропрепараты изучали на световом микроскопе Axioscope 40 (Zeiss, Германия), цифровые изображения получали с использованием камеры Canon G5 (Canon, Япония), обработка цифровых изображений проводилась с помощью программного пакета Axiovision 4,8 (Zeiss, Германия).

7. Морфометрическое исследование печени, легких и почек крыс. На гистохимических препаратах печени, легких и почек крыс подсчитывали количество Перлс-позитивных клеток в мм<sup>2</sup> среза органа. Перлс-положительные клетки разделяли на 3 класса: 1 класс – клетки, цитоплазма которых перегружена Перлс-позитивными гранулами (более 30 шт.); 2 класс – клетки, с умеренно нагруженной гранулами цитоплазмой, 3 класс – клетки, содержащие единичные Перлс-позитивные гранулы (не более 5 шт.) [Автандилов Г.Г., 1990; Гуцол А.А. и др., 1990].

8. Гистоэнзимологическое исследование активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), 3-гидроксибутиратдегидрогеназы (3-ГБДГ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) гепатоцитов, эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев почек и кардиомиоцитов. Материал для гистоэнзимологического исследования замораживали в охлажденном жидким азотом петролейном эфире и хранили в морозильной камере Sanio Ultra low MDF-192 (Sanyo Electric Co., Ltd., Япония) при -75°C. Из замороженных органов в криостате МК-25 (Технолог, СССР) готовили срезы толщиной 10 мкм. Активность перечисленных выше ферментов на срезах внутренних органов выявляли в соответствии с рекомендациями З. Ллойда и соавт. [Ллойда З., 1982; James J. et al., 1986]. Количественную оценку активности ферментов производили на микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ (ЛОМО, СССР) в проходящем свете, длина волны 546 нм, зонд площадью 0,5 мкм<sup>2</sup>. Оптическую плотность измеряли не менее чем в 50 клетках препарата: в печени - гепатоциты, в сердце – кардиомиоциты, в почке - эпителиоциты проксимальных извитых канальцев.

9. Ультрaструктурное исследование печени и легких крыс. Фрагменты органов фиксировали в 4% параформальдегиде на буфере Хэнкса рН 7,4 (Вектор, Россия) в течение 24 ч при 4°C, затем 2 ч в 1% OsO<sub>4</sub> на том же буфере при 4°C.

Материал обезвоживали в этиловом спирте, после чего заливали в смесь эпоксидных смол Epon 812, Araldit и DDSA (SERVA Electrophoresis, Германия) в соотношении 2 : 1 : 4,5, соответственно. Полутонкие ( $\approx 1$  мкм) и ультратонкие ( $\approx 80$  нм) срезы получали с помощью ультратома Leica EM UC 7 (Leica, Австрия). Ультратонкие срезы помещали на медные сетки, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца (Сигма-Алдрич Рус, Россия), после чего просматривали и фотографировали при различных увеличениях [Уикли Б., 1975].

10. Взятие крови осуществляли в вакуумные пластиковые контейнеры (Venasafe, Италия), содержащие ЭДТА. Центрифугирование проводилось в течение 10 мин при 1000g (радиус ротора-17,5 см) после чего плазму крови собирали в микропробирки (Eppendorf, США) и хранили при  $-10^{\circ}\text{C}$  [Ткачук В.А., 2004].

11. В плазме крови определяли активность ряда органоспецифичных ферментов (Ед/л) и концентрацию метаболитов (ммоль/л, мкмоль/л) на автоматическом биохимическом анализаторе СА-180 (Furuno Electric CO, Япония).

12. Изучение ультраструктуры поверхности эритроцитов с помощью растровой электронной микроскопии. Венозную кровь забирали в пипетку Сали через 1, 7, 14, 21 и 40 суток после однократного введения суспензий. Затем 20 мкл цельной крови помещали в микропробирку (Eppendorf, США) с 0,5 мл 2,5%-го раствора глютарового альдегида на фосфатном буфере pH 7,2-7,4. Далее проводили дополнительную фиксацию эритроцитов в 1%  $\text{OsO}_4$  с последующим двукратным отмыванием фосфатным буфером pH 7,2-7,4 (Биомедикал Системс, Россия). Обезвоживание эритроцитарной массы осуществляли в растворах этилового спирта восходящей концентрации 30%, 50%, 70%, 90%, 100% (по 15 мин в каждом) и дважды в 100% ацетоне. Исследования проводили с помощью растрового электронного микроскопа Hitachi S 3400 N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума [Новицкий В.В. и др., 2008].

13. Статистическая обработка результатов. Для обработки количественных данных использовалась программа «SPSS 14.0». Результаты исследования представлены в виде средней и стандартного отклонения ( $X \pm s$ ). Выборки на соответствие нормальному закону распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для выяснения достоверности различий средних значений морфометрических, гистоэнзимологических и биохимических показателей между экспериментальными группами использовали t-тест для независимых выборок (тест Стьюдента) и тест Фридмана для зависимых выборок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Существенное значение для применения наноразмерных частиц в биологии и медицине имеет приготовление седиментационно устойчивых коллоидных растворов на основе биосовместимых стабилизаторов [Мильто И.В. и др., 2008; Першина А.Г. и др., 2008;].

Невысокие значения дзета-потенциала агломератов/наночастиц покрытых углеродом в физиологическом растворе указывают на их низкую

седиментационную и агрегационную устойчивость. Результаты, полученные методом динамического светорассеяния, продемонстрировали присутствие крупных (до 110 нм) агломератов наночастиц. Визуально такие суспензии утрачивали свою коллоидную стабильность в течение 1,5-2 ч. Данная совокупность фактов говорит о низкой седиментационной устойчивости суспензий покрытых углеродом наночастиц железа и указывает на необходимость их дополнительной поверхностной модификации с целью повышения их стабильности [Бычкова А.В. и др., 2012].

Для стабилизации суспензии покрытых углеродом наночастиц железа нами был применен принцип образования мицелл на основе амфифильных молекул. В работе использован 1,2-дистеароил-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] аммониевая соль (DSPE-PEG-2000) – амфифильная молекула сополимеров, которая содержит в своей структуре как гидрофильные, так и гидрофобные группы. Такая структура способна инкапсулировать гидрофобные наночастицы, помещая их в ядро DSPE, а оболочка из ПЭГ обеспечивает гидрофильность наноконструкции [Wu H. et al., 2013].

Суспензия магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа обладала более высокой стабильностью и сохраняла седиментационную устойчивость в течение 5 дней. Кроме того, более высокие значения дзета-потенциала подтверждают повышение коллоидной устойчивости суспензии [Крушенко Г.Г. и др., 2011; Пименова Н.В., 2011].

МРТ исследование проводилось с целью прижизненного выявления распределения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе в организме крыс [Hilger I. et al., 2002; Perez J.M. et al., 2002; Сергеев П.В. и др., 2007].

После введения исследуемых наноструктур выявляли подавление сигнала и ухудшение качества изображения в области грудной и брюшной полостей, что обусловлено активным участием легких, печени, селезенки и почек в фармакокинетике покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе [Vonnemain B., 1998].

Выявленные структурные изменения печени, легких, селезенки, почек и сердца крыс после однократного и многократного введения покрытых углеродом наночастиц железа, а также магнитомицелл на их основе, при нормальном строении органов крыс интактной группы указывают на то, что они вызваны воздействием изучаемых наноструктур. Схожесть морфологических изменений свидетельствует о том, что они обусловлены влиянием покрытых углеродом наночастиц железа, а их выраженность определяется модификацией (магнитомицеллы) и дозой введенного наноматериала [Мильто И.В. и др., 2008; Мильто И.В. и др., 2009; Мильто И.В. и др., 2012].

Наиболее активно в накоплении и элиминации наноструктур участвует печень, что обуславливает наиболее выраженные изменения ее структуры, выявленные в течение эксперимента [Okon E. et al., 1994; Nishimori H. et al., 2009]. При однократном (в дозах 6 и 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>) и многократном

введении покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе наблюдали комплекс дисциркуляторных расстройств в строме (полнокровие междольковых артерий и вен, расширение и запустевание синусоидных капилляров, гиперемия и расширение центральных вен), а также дистрофические и некротические изменения гепатоцитов [Boland S. et al., 2000; Liao M.H. et al., 2001; Schins R.P. et al., 2002; Rehn B. et al., 2003; Cherukuri P. et al., 2004; Kouassi G.K. et al., 2005].

При повышении дозы однократного введения (до 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>), а также при многократном введении описанные изменения принимали более выраженный характер. С другой стороны, при введении магнитомицелл фиксировали менее существенные нарушения структуры печени, чем у животных с однократным введением немодифицированных покрытых углеродом наночастиц железа в аналогичных дозировках [Логинов А.С. и др., 1994; Ito A. et al., 2004; Rosi N.L. et al., 2005].

С увеличением срока эксперимента после однократного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе наблюдали нормализацию структуры органа, что указывает на наличие механизмов элиминации наноструктур, способности органа к восстановлению, а также о развитии компенсаторно-приспособительных реакций печени крыс. После многократного введения исследуемых наноконструкций нормализации структуры печени в течение эксперимента не наблюдали [Мецлер Д., 1980].

После однократного и многократного введения изучаемых наноконструкций в печени крыс выявляли Перлс-положительные клетки по своей локализации и структуре соответствующие мононуклеарным фагоцитам. Данные клетки располагались повсеместно однако большинство из них лежало в соединительной ткани области триад. С увеличением срока эксперимента при однократном введении изучаемых наноконструкций общее количество Перлс-положительных клеток уменьшалось, что указывает на существование в печени механизмов элиминации наночастиц железа. В то же время при многократном введении покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе такой картины не фиксировали. Снижение количества Перлс-позитивных клеток можно объяснить не только миграцией звездчатых макрофагов или внутриклеточным метаболизмом наночастиц железа, но и гибелью клеток Купфера, которые поглотили изучаемые наноконструкции. Высвобожденный в этом случае наноматериал, вероятно, перераспределяется между другими фагоцитами. Постепенное увеличение количества Перлс-положительных клеток после многократного введения суспензий покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе обусловлено дополнительным введением наноконструкций [Decker K., 1990; Hardonk M.J. et al., 1992; Zhang Y. et al., 2002; van Til N.P. et al., 2005].

Следует отметить, что магнитомицеллы менее склонны к накоплению в печени крыс, чем немодифицированные покрытые углеродом наночастицы железа, что объясняется наличием молекул ПЭГ в их структуре. Скопление большинства Перлс-положительных клеток в области портальных трактов

иллюстрирует возможность их миграции в междольковые желчные протоки, с последующей эвакуацией в составе желчи в просвет ЖКТ [Decker K., 1990; Hardonk M.J. et al., 1992; Zhang Y. et al., 2002; van Til N.P. et al., 2005].

В гепатоцитах крыс всех экспериментальных групп Перлс-позитивных гранул выявлено не было, что можно объяснить не участием этих клеток в поглощении покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе, либо недостаточной чувствительностью применяемого гистохимического метода [Sumi Y. et al., 1983].

Ультраструктурное исследование печени экспериментальных животных выявило в клетках, по локализации и структуре соответствующим звездчатым макрофагам, наличие везикул с электронноплотным материалом. Структура содержимого везикул, а также отсутствие данного материала в аналогичных клетках крыс интактной группы указывает на то, что это агломераты покрытых углеродом наночастиц железа. При однократном введении изучаемых наноконструкций отмечали снижение как количества материала высокой электронной плотности в полости описанных везикул, так и количества самих везикул с увеличением срока эксперимента, чего не фиксировали при многократном внутривенном введении.

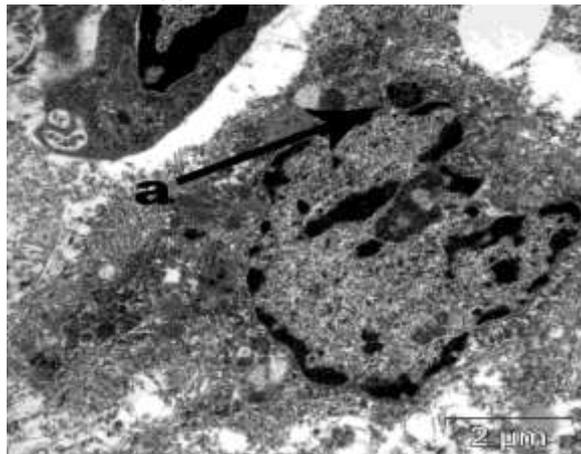


Рисунок 1. Печень крысы через 1 сутки после однократного введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа (5-я группа). Фрагмент цитоплазмы клетки Купфера с везикулой (а), содержащей электронноплотный материал. Трансмиссионная электронная микроскопия.

В легких крыс после однократного и многократного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе наблюдали дисциркуляторные изменения, которые были представлены гиперемией и спазмом артерий, полнокровием вен, гиперемией сосудов микроциркуляторного русла, общим и периваскулярным отеком, следствием чего было расширение межальвеолярных перегородок. Наличие инфильтратов, которые в большинстве случаев располагались перибронхиально, указывает на возможность покрытых углеродом наночастиц железа инициировать воспалительные реакции [Nemmar A. et al., 2001; Kreyling W.G. et al., 2002]. Несомненно, перечисленные изменения в таком жизненно важном органе как легкое, способны влиять на эффективность газообмена и вызвать системные нарушения гипоксического характера [Brown J.S. et al., 2002]. Как и в печени крыс выраженность и продолжительность

морфологических изменений легких зависела от дозы и дополнительной модификации (магнитомицеллы) наноматериала. При увеличении дозы однократного введения, а также при многократном введении изучаемых нанокострукций наблюдали более выраженные и продолжительные структурные изменения легких крыс.

Обращает на себя внимание, что нормализация структуры легких у крыс после введения покрытых углеродом наночастиц железа в дозе 6 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub> происходит в более ранние сроки, чем при введении магнитомицелл в той же дозировке. По-видимому, это обусловлено меньшей подверженностью магнитомицелл к фагоцитозу МНФ и более длительному пребыванию в организме [Lubbe A.S. et al., 2001; Wu H. et al., 2013]. После введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе в дозе 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub> в течение 40 суток нормализации структуры легких не наблюдали.

Выявленные изменения в легких могут быть вызваны как прямым, так и опосредованным воздействием наночастиц на альвеолоциты и эндотелий легкого крыс. Опосредованное, может быть обусловлено факторами, выделяемыми активированными макрофагами, инициацией перекисного окисления липидов или плазменных систем [Decker K., 1990; Oberdorster G. et al., 2000; Nemmar A. et al., 2001; Kreyling W.G. et al., 2002; Colvin V., 2003; Nishimori H. et al., 2009].

В легких крыс после введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе выявляли Перлс-положительные клетки по структуре и расположению соответствующие альвеолярным и интерстициальным макрофагам.

При однократном введении наноматериала с увеличением срока эксперимента фиксировали снижение общего количества макрофагов, содержащих Перлс-положительные гранулы. Данный факт демонстрирует наличие механизмов элиминации покрытых углеродом наночастиц железа из легких, это может достигаться за счет миграции этих клеток за пределы органа, либо внутрилизосомальным разрушением наночастиц железа. При многократном введении покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе наблюдали увеличение количества Перлс-положительных клеток, что объясняется ростом суммарной дозы наноматериала [Sayes C. M. et al., 2004; Nel A. et al., 2007].

Следует отметить, что клетки 1-го и 2-го классов преимущественно располагались в просвете альвеол, бронхиол и бронхов, клетки 2-го класса встречались перибронхиолярно и перибронхиально, фагоциты 3-го класса фиксировали периваскулярно и в межальвеолярных перегородках.

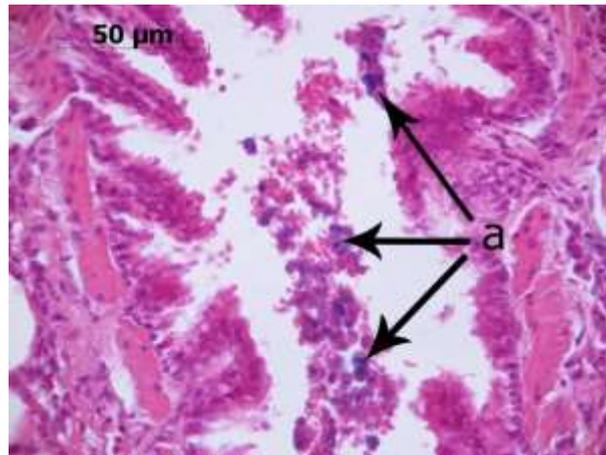


Рисунок 2. Легкое крысы на 14 сутки после многократного введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа (7-я группа). Перлс-положительные клетки 1-го и 2-го классов в просвете бронха (а). Окр.: реакция Перлса с докраской гематоксилином и эозином. Ув. 400.

Выявленная закономерность объясняет возможный механизм элиминации наноматериала из легких. Накопив максимальное количество наночастиц макрофаги мигрируют в просвет бронхиального дерева и эвакуируются с помощью мукоциллиарного транспорта.

Ультраструктурное исследование легких крыс продемонстрировало наличие клеток по своей структуре и локализации соответствующих альвеолярным и интерстициальным макрофагам, в цитоплазме которых выявляли органеллы внутриклеточного переваривания, содержащие в своей полости электронноплотный материал. По морфологии данный материал соответствовал тому, что был описан при ультраструктурном исследовании макрофагов печени крыс и, по-видимому, представлял собой агломераты покрытых углеродом наночастиц железа. Более того, отмечали схожую динамику количества данного материала, а также количества везикул, описанных при ультраструктурном исследовании печени крыс.

Морфологические изменения почек крыс после однократного и многократного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе представлены нарушениями дисциркуляторного характера в строме органа, а также дистрофическими и некротическими изменениями нефроцитов проксимальных и дистальных извитых канальцев. Выраженность и продолжительность наблюдаемых изменений прямо зависела от дозы наноматериала и его модификации.

Наличие Перлс-положительной реакции в нефроцитах проксимальных извитых канальцах и макрофагах межканальцевой соединительной ткани, а также морфологических (функциональных и органических) изменений в почках указывает на их активное участие в фармакокинетике покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе [Мильто И.В. и др., 2008, 2009, 2012].

В почках крыс после однократного и многократного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе выявляли Перлс-положительные гранулы в клетках по морфологии и расположению

соответствующих интерстициальным макрофагам. Перлс-позитивные клетки располагались в межканальцевой соединительной ткани коркового и мозгового вещества почек. Снижение общего количества Перлс-позитивных клеток после однократного введения наноматериала с увеличением срока эксперимента указывает на существование в почках механизмов его элиминации, например, клубочковой фильтрацией или канальцевой секрецией [Ma P. et al., 2012].

Наличие в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев нефрона Перлс-положительных гранул как при однократном, так и при многократном введении покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе свидетельствует о возможном выведении наноматериала путем канальцевой секреции [Guzman M. et al., 2000].

По-видимому, нефроциты наиболее активно участвуют в выведении магнитомицелл в первые часы после введения, что подтверждается ранним появлением в них Перлс-позитивных гранул. При инъекции магнитомицелл Перлс-позитивные нефроциты фиксировались в более поздние сроки, чем после введения немодифицированных покрытых углеродом наночастиц железа, что говорит о том, что модификация наночастиц DSPE-PEG-2000 потенцирует их выведение из организма путем канальцевой секреции [Ma P. et al., 2012].

Большое значение для фармакодинамики и фармакокинетики наноматериала играет молекулярная масса, а также структура DSPE-PEG. Молекулярная масса сополимера, который мы использовали для образования мицелл составляла 2000 Да [Manil L et al., 1994; Guzman M. et al., 2000].

Более длительное присутствие Перлс-положительных макрофагов в почках крыс после введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа можно объяснить высокой гидрофильностью магнитомицелл, позволяющей им дольше циркулировать в кровеносном русле [Guzman M. et al., 2000] и более эффективно выводиться из организма почками.

Селезенка крыс имеет развитую систему МНФ, которая позволяет ей участвовать в поглощении и выведении покрытых углеродом наноразмерных частиц железа и магнитомицелл на их основе. Следует отметить, что селезенка активно участвует в метаболизме эндогенного железа, что оказывает влияние на выраженность в ней реакции Перлса и объясняет наличие в органе Перлс-положительных клеток у интактных крыс. Захватывая и кумулируя крупные агломераты покрытых углеродом наноразмерных частиц железа, макрофаги селезенки обеспечивают системный защитный эффект, предотвращая повреждения циркулирующими наночастицами других органов [Demou M. et al., 1999].

В селезенке животных после однократного и многократного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе наблюдали слабовыраженные нарушения дисциркуляторного характера без признаков повреждения паренхимы [Мильто И.В. и др., 2012].

В сердце крыс после однократной и многократной инъекции покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе наблюдали незначительные морфологические изменения, что наряду с отрицательной

реакцией Перлса указывает на низкую степень его участия в фармакокинетике наноматериалов [Мильто И.В. и др., 2012].

Однократное и многократное введение суспензии покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе приводило к повышению количества патологических форм эритроцитов крыс по сравнению с кровью животных интактной группы. Нормализация количества патологических форм эритроцитов у крыс после однократного введения изучаемых наноконструкций наступала к 21 суткам. При многократном введении, в силу высокой суммарной дозы наноматериала нормализации данного показателя не наблюдали. Следует отметить, что количество патологических форм эритроцитов у животных с инъекцией покрытых углеродом наночастиц железа превышало таковое у животных после введения магнитомицелл в аналогичных дозировках. Нельзя исключать и потенциальное действие исследуемых наноконструкций на систему кроветворения. Помимо печени и селезенки наночастицы различной природы накапливаются в красном костном мозге [Глуценко Н.Н., 2002; Nishimori H. et al., 2009].

Менее выраженные структурные изменения эритроцитов после однократного и многократного введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа, по-видимому, обусловлены модификацией последних молекулами DSPE-PEG-2000. Степень воздействия на структуру эритроцитов в значительной степени зависит от молекулярной массы и степени разветвленности цепочек ПЭГ во внешнем слое магнитомицелл. Высокая степень разветвленности значительно снижает иммуногенность наночастиц и степень повреждения эритроцитов в кровеносном русле [Никитин И.Г. и др., 2005].

Для выявления функциональных изменений клеток паренхимы внутренних органов, обусловленных воздействием изучаемых наноконструкций был проведен комплекс гистоэнзимологических (определение внутриклеточной активности СДГ, ЛДГ, ЩФ и ГБДГ) и биохимических (определение в плазме крови активности АСТ, АЛТ, ЛДГ, ЩФ, КФК, КФК-МВ,  $\gamma$ -ГТ, ГБДГ и концентрации общего белка, глюкозы, мочевины, креатинина, общего и конъюгированного билирубина) исследований [Меньшикова В.В., 2002; В.А. Ткачук В.А., 2004].

В гепатоцитах крыс после однократного и многократного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе выявили снижение активности СДГ, ГБДГ и ЩФ, а также повышение активности ЛДГ.

Снижение активности СДГ и ГБДГ при одновременном повышении активности ЛДГ в гепатоцитах указывает на смещение энергетического метаболизма в сторону анаэробных процессов [Глуценко Н.Н. и др., 2002; Nishimori H. et al., 2009]. Снижение активности ЩФ может быть обусловлено повреждением гепатоцитов и снижением их функциональной активности, в том числе интенсивности трансмембранного транспорта [Jani P.U. et al., 1994; Меньшикова В.В., 2002; Карпищенко А.И., 2002].

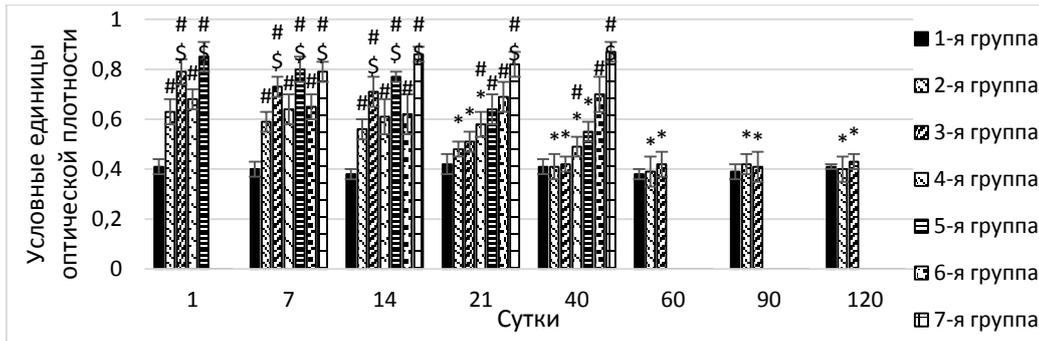


Рисунок 3. Активность СДГ в нефроцитах крыс после однократного и многократного внутривенного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе.

В кардиомиоцитах крыс после однократного и многократного введения изучаемых наноконструкций отмечали повышение активности СДГ и снижение активности ЛДГ, что указывает на смещение энергетического метаболизма в сторону аэробных условий.

В эпителиоцитах проксимальных извитых канальцев почек крыс после однократного и многократного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе выявили повышение активности СДГ и ЩФ, а также снижение активности ЛДГ и ГБДГ.

Выраженность, обнаруженных изменений активности ферментов в гепатоцитах, кардиомиоцитах и нефроцитах крыс зависела от дозы и поверхностной модификации наноматериала. Так, при повышении дозы однократного введения до 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub> выявляли более существенные нарушения. Однако, с увеличением срока эксперимента при однократном введении наблюдали приближение показателей к референтным значениям, что, по-видимому, связано с элиминацией основного количества наноматериала из организма и развитием адаптативных процессов. При многократном введении изучаемых наноконструкций такой картины не наблюдали [Мильто И.В. и др., 2011]. В тоже время, использование магнитомицелл приводило к менее существенным изменениям активности внутриклеточных ферментов в гепатоцитах и кардиомиоцитах крыс, в то время как в нефроцитах в отношении активности СДГ и ЩФ наблюдали обратную картину, что связано с интенсификацией процессов элиминации магнитомицелл почками.

Обобщая полученную информацию, можно сделать вывод, что влияние покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе вызывает активацию того типа энергетического метаболизма, который характерен для определенного вида клеток или наиболее оптимален в данный момент. В кардиомиоцитах и нефроцитах происходит усиление аэробного пути энергетического метаболизма, в то время как в гепатоцитах – анаэробного [Koneracka M. et al., 1999; Liao M.H. et al., 2001; Koneracka M. et al., 2002; Щербак И.Г., 2005; Kouassi G.K. et al., 2005; Северин Е.С., 2006; Yang Z. M. et al., 2007; Hong J. et al., 2007].

Определение активности органоспецифичных ферментов в плазме крови крыс позволяет оценить функциональное состояние внутренних органов и обнаружить признаки повреждения клеток паренхимы на этапе

предшествующему их морфологическому проявлению [Меньшикова В.В., 2002; В.А. Ткачук В.А., 2004].

После однократного и многократного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе отмечали повышение активности ЩФ, АСТ, АЛТ,  $\gamma$ -ГТ, ЛДГ, ГБДГ, КФК и КФК-МВ. При увеличении дозы до 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub> фиксировали более выраженный и стойкий рост активности ферментов в плазме крови. Активность перечисленных ферментов у крыс после однократного введения покрытых углеродом наночастиц железа была выше, чем у животных после однократной инъекции магнитомицелл в аналогичных дозах [Мильто И.В. и др., 2008].

Многократное введение покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе приводило к тем же результатам, что и после однократного введения, однако нормализации активности ферментов в течение эксперимента не наблюдали, что связано с высокой суммарной дозой наноматериала [Мильто И.В. и др., 2012].

Результаты гистохимического исследования позволили сделать предположение, что элиминация изучаемых наноконструкций из печени осуществляется путем миграции МНФ накопивших определенное количество наноматериала в просвет желчных протоков с последующим выведением в ЖКТ. По-видимому, изменения плазменной активности ЩФ и  $\gamma$ -ГТ являются следствием повреждения эпителия слизистой оболочки желчевыводящих путей и кишечника. Более существенное изменение активности ЩФ и  $\gamma$ -ГТ при повышении дозы однократного введения наноматериала до 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub> можно объяснить большей выраженностью его накопления в печени и, соответственно, повышением интенсивности его выведения описанным механизмом. Повышение плазменной активности этих ферментов можно также объяснить повреждением нефроцитов, которые отмечались при гистологическом исследовании почек [Decker K., 1990; Hardonk M.J. et al., 1992; Zhang Y. et al., 2002; van Til N.P. et al., 2005].

Повышение активности АСТ, АЛТ и ЛДГ в плазме крови крыс после однократного и многократного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе может быть вызвано повреждением гепатоцитов и/или кардиомиоцитов.

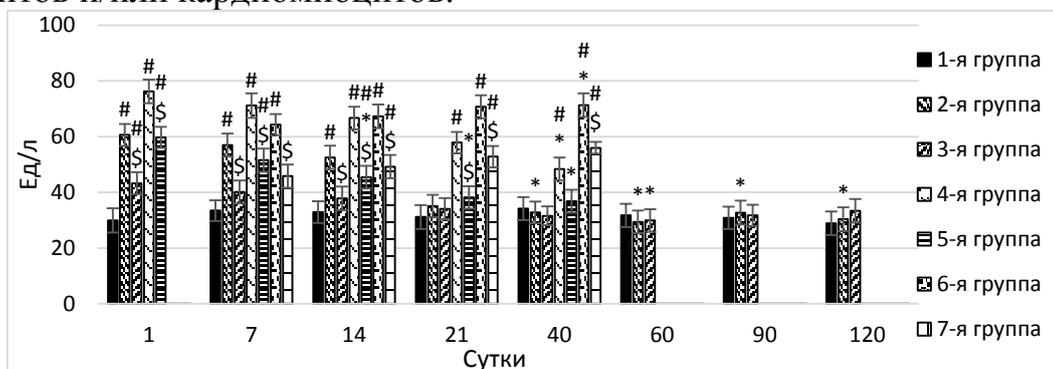


Рисунок 4. Активность АЛТ в плазме крови крыс после однократного и многократного внутривенного введения покрытых углеродом наночастиц железа и магнитомицелл на их основе.

Повышение активности ГБДГ, КФК и КФК-МВ обусловлено повреждением клеток, главным образом, кардиомиоцитов. Идентичная динамика изменения активности КФК и КФК-МВ говорит о том, что изменение активности КФК обусловлено ростом активности КФК-МВ [Райдер К., 1983; Меньшикова В.В., 2002].

Через 1 сутки после однократного введения покрытых углеродом наночастиц железа в дозах 6 и 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>, в плазме крови крыс наблюдали снижение концентрации общего белка, глюкозы и конъюгированного билирубина, а также увеличение концентрации общего билирубина, креатинина и мочевины. Увеличение дозы до 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub> приводило к более выраженному и продолжительному изменению концентрации данных метаболитов в плазме крови. Однократное введение магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа, также приводило к подобным эффектам, однако, в меньшей степени, чем после инъекции покрытых углеродом наночастиц железа в аналогичных дозах [Мильто И.В. и др., 2008]. Следует отметить, что многократное введение магнитомицелл вызывало менее выраженные изменения обсуждаемых показателей, по сравнению с многократным введением покрытых углеродом наночастиц железа. Нормализации биохимических показателей в этих группах в течение эксперимента не наступало в связи с постоянным введением наноматериала [Мильто И.В. и др., 2012].

Снижение концентрации общего белка может быть обусловлено снижением функциональной активности гепатоцитов в результате токсического воздействия на них изучаемого наноматериала. Полученные результаты хорошо согласуются с данными гистологического исследования: группы гепатоцитов находились в состоянии зернистой или гидропической дистрофии, а также некроза [Мильто И.В. и др., 2008, 2009].

Изменение концентрации общего и конъюгированного билирубина может быть вызвано повреждением гепатоцитов, активацией метаболизма МНФ и нарушением систем транспорта непрямого билирубина в гепатоциты. В результате повреждающего эффекта наночастиц железа в отношении гепатоцитов снижается способность последних к синтезу прямого билирубина, что также повышает концентрации непрямого билирубина в плазме крови [Карпищенко А.И., 2002, 2008; Рогожин В.В. и др., 2009].

Наблюдаемые изменения концентрации мочевины в плазме крови крыс могут говорить о снижении экскреторной функции почек вследствие повреждающего воздействия исследуемого наноматериала. Более того, данное явление может быть объяснено повреждающим воздействием наночастиц на другие органы, которое сопровождается интенсивным распадом белков [Меньшикова В.В., 2002; В.А. Ткачук В.А., 2004].

Повышение концентрации креатинина в плазме крови животных объясняется снижением выведения его через почки вследствие их повреждения [Мильто И.В. и др., 2012].

Данные биохимического исследования плазмы крови крыс хорошо согласуются с результатами гистологического и гистохимического исследований. Менее выраженные структурные изменения печени, почек и сердца крыс после введения магнитомицелл на основе покрытых углеродом наночастиц железа, соответствовали менее выраженным изменениям биохимических показателей плазмы крови, по сравнению с животными после введения немодифицированных покрытых углеродом наночастиц железа [Мильто И.В. и др., 2008; Мильто И.В. и др., 2009].

#### **Выводы:**

1. Заключение покрытых углеродом наночастиц железа в мицеллы из DSPE-PEG-2000 повышает агрегативную и седиментационную устойчивость их водно-солевой суспензии.

2. Однократное внутривенное введение магнитомицелл сопровождается гемодинамическими расстройствами в строге изученных органов, а также дистрофическими и некротическими изменениями клеток паренхимы печени и почек крыс, выраженность и продолжительность которых зависела от дозы введенного наноматериала.

3. Однократная инъекция магнитомицелл сопровождается зависимыми от дозы обратимыми нарушениями энергетического и пластического метаболизма гепатоцитов, нефроцитов проксимальных извитых канальцев и кардиомиоцитов, а также повышением активности органоспецифичных ферментов и концентрации метаболитов плазмы крови крыс.

4. Увеличение дозы однократного внутривенного введения до 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>, а также многократное внутривенное введение (от 24 до 120 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>) магнитомицелл вызывает более выраженные и продолжительные изменения структурно-функционального состояния печени, легких, почек, сердца и селезенки крыс по сравнению с их однократной инъекцией в дозе 6 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>.

5. Внутривенное введение магнитомицелл сопровождается увеличением количества и разнообразия патологических форм эритроцитов в крови крыс; выраженность и продолжительность этого эффекта увеличивались при повышении дозы однократного введения до 60 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>, а также при многократном введении наноматериала (от 24 до 120 мг(Fe)/кг<sub>(массы тела)</sub>).

6. Морфо-функциональные изменения внутренних органов, а также накопление наночастиц в макрофагах печени, легких, селезенки и почек крыс менее выражены после введения магнитомицелл по сравнению с покрытыми углеродом наночастицами железа.

#### **Список работ, опубликованных автором по теме диссертации**

1. Влияние магнитомицелл на основе наночастиц железа, покрытых углеродом, на структуру печени крыс / Г.Ю. Васюков, И.В. Мильто, И.В. Суходоло, И.В. Митрофанова // **Бюллетень сибирской медицины (0,331)**. – 2015. – №2. – Т. 14. – С. 5-11.

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

3. Изучение динамики CD68<sup>+</sup> и CD163<sup>+</sup> 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. 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.

5. Поверхностно модифицированные магнитные наночастицы для медико-биологического применения / Г.Ю. Васюков, И.В. Мильто, И.В. Суходоло, И.В. Митрофанова // **Бюллетень сибирской медицины (0,331)**. – 2014. - №6. – Т.13. – С. 33-40.

6. Ультраструктура внутренних органов крыс после внутривенного введения модифицированных наночастиц магнетита 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

7. Васюков Г.Ю. Механизмы повреждения клеток наноразмерными частицами / Г.Ю. Васюков, И.В. Митрофанова // Проблемы медицины и биологии. – Кемерово, 2013. – С. 12-16.

8. Васюков Г.Ю. Влияние однократного внутривенного введения стабилизированной суспензии наномагнетита, модифицированного хитозаном, на морфо-функциональное состояние внутренних органов крыс / Г.Ю. Васюков // Проблемы медицины и биологии. – Кемерово, 2013. – С. 41.

9. 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.

10. Vasukov G.Y. Morfology of main internal organs after intravenous injection of magnetoliposomes / G.Y. Vasukov // Материалы VI Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и ученых. – Москва, 2011. - С. 220

11. Васюков Г.Ю. Морфология внутренних органов крыс при внутривенном введении магнитолипосом / Г.Ю. Васюков // Материалы всероссийской 70-й итоговой студенческой конференции им. Н.И. Пирогова. – Томск, 2011. – С. 250.

12. Влияние многократного внутривенного введения суспензии наноразмерных наночастиц магнетита на морфологию жизненно важных органов крыс / Г.Ю. Васюков, О.И. Острикова, В.В. Иванова и др. // Материалы IV Международной научной конференции молодых ученых-медиков. – Курск 2010. – С. 207.

13. Васюков Г.Ю. Морфология жизненно важных органов крыс при длительном воздействии наноразмерных частиц магнетита / Г.Ю. Васюков, О.И.

Острикова // Материалы V Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и ученых. – Москва, 2010. - С. 470.

14. Морфология печени крыс после многократного внутрижелудочного введения наноразмерных частиц  $TiO_2$  / Г.Ю. Васюков, А.О. Панова, В.А. Прокопьева // Материалы всероссийской 69-й итоговой студенческой конференции им. Н.И. Пирогова. – Томск, 2010. – С. 290.

### **Список сокращений**

$\gamma$ -ГТ –  $\gamma$ -глутамилтрансфераза  
АЛТ – аланинаминотрансфераза  
АСТ – аспартатаминотрансфераза  
ГБДГ – гидроксibuтиратдегидрогеназа  
КФК – креатинфосфокиназа  
КФК-МВ – креатинфосфокиназа МВ  
ЛДГ – лактатдегидрогеназа  
МНФ – мононуклеарные фагоциты  
МРТ – магнитно-резонансная томография  
СДГ – сукцинатдегидрогеназа  
ЩФ – щелочная фосфатаза  
ПЭГ – полиэтиленгликоль

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедрой морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, д-ру мед. наук, профессору Суходоло И.В., руководителю отделения рентгеновских и томографических методов диагностики ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН, д-ру мед. наук Усову В.Ю., руководителю сектора гематологии, иммунологии и морфологии ЦНИЛ ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, д-ру мед. наук Шевцовой Н.М., научному сотруднику лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, ФГБНУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии», канд. мед. наук Климову И.А., а также ведущему инженеру ЦКП «Нанотех» ИФПМ СО РАН, канд. физ.-мат. наук Миллеру А.А.