

На правах рукописи

Мильто Иван Васильевич

**ВЛИЯНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА НА МОРФО-
ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ КРЫС**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Суходоло Ирина Владимировна
кандидат биологических наук, доцент Климентьева Татьяна Константиновна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Петрова Ирина Викторовна
доктор биологических наук, профессор Гришанова Алевтина Юрьевна

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный университет»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2010 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д. 208.096.03 при ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан «___» _____ 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Герасимов А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Развитие технологий, основанных на применении наноразмерных материалов в биологии и медицине, открывает широкие возможности для создания новых методов диагностики и лечения заболеваний человека и животных различной этиологии [Martina M.S. et al., 2005; Fortin-Ripoche J.P. et al., 2006; Neilsen O.S. et al., 2001; Lubbe A.S. et al., 1999; Pankhurst Q. A. et al., 2003; Berry C. et al., 2003; Rosi N.L. et al., 2005].

Широкое распространение получили наноматериалы неорганического происхождения, в том числе наноразмерные частицы оксида железа [Tan M.H. et al., 1996; Ito A. et al., 2003; Weissleder R. et al., 1995; Warheit D.B. et al., 2003; Zhang Y. et al., 2002]. Наноразмерные частицы оксида железа изучаются, как основа для создания высокоэффективных систем очистки биологических жидкостей, магнитоуправляемых систем целевой доставки терапевтических агентов, как самостоятельные терапевтические агенты для локальной гипертермии, а также как контрастные вещества при магнитно-резонансных исследованиях [Gu H. et al., 2006; Bonnemain B. et al., 1998; Perez J.M. et al., 2002; Jendelova P. et al., 2004].

Преобладающее количество работ посвящено изучению свойств наноматериалов *in vitro* [Беликов В.Г., 2004; Pankhurst Q. A. et al., 2003; Gu H. et al., 2006; Dobson G., 2006; Koneracka M. et al., 1999; Kouassi G.K. et al., 2005; Krofitz F. et al., 2003]. Имеется сравнительно мало работ по влиянию различных видов наноматериалов на организменном уровне [Bonnemain B. et al., 1998; Park J.W., 2002; Nishimori H. et al., 2009; Moore A. et al., 2000]. Не изучена фармакокинетика и фармакодинамика наноматериалов, неоднозначно определены органы-мишени, характер вызываемых в них изменений, механизмы защитных и компенсаторно-приспособительных реакций, вызываемых в организме после их использования. Изучение взаимодействия наноматериалов с организмом является необходимым этапом исследований при разработке их биомедицинского приложения и обязательным условием для создания терапевтических средств нового поколения.

Цель исследования: изучить влияние внутривенного введения наноразмерных частиц магнетита на морфо-функциональное состояние внутренних органов крыс.

Задачи исследования:

1. Приготовить и провести стандартизацию суспензии наноразмерных частиц магнетита для внутривенного введения.

2. Провести скрининговое морфологическое исследование внутренних органов крыс после однократного ($100 \text{ мг}_{(\text{Fe}_3\text{O}_4)}/\text{кг}_{\text{массы тела}}$) и многократного (от $300 \text{ мг}_{(\text{Fe}_3\text{O}_4)}/\text{кг}_{\text{массы тела}}$ до $2 \text{ г}_{(\text{Fe}_3\text{O}_4)}/\text{кг}_{\text{массы тела}}$) внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита.

3. Изучить влияние наноразмерных частиц магнетита на морфо-функциональное состояние печени, сердца и почек крыс в различные сроки после однократного и многократного (от 3 до 20 инъекций) внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита.

4. Оценить динамику изменений активности органоспецифичных ферментов и концентрации метаболитов, отражающих функциональное состояние печени, сердца и почек.

5. Определить влияние наноразмерных частиц магнетита на состояние про- и антиоксидантной систем плазмы крови крыс после их внутривенного введения.

Научная новизна. Впервые проведена комплексная оценка эффектов внутривенного введения немодифицированных НЧМ в эксперименте. Впервые выявлен комплекс морфологических и биохимических изменений, обусловленных внутривенным введением наноразмерного магнетита. Установлено, что частицы магнетита накапливаются в клетках системы мононуклеарных фагоцитов печени, легкого, селезенки, почек и сердца крыс, вызывая комплекс морфологических изменений (дисциркуляторные расстройства, моноцеллюлярные некрозы). Впервые проведен ультраструктурный анализ печени после внутривенного введения суспензии НЧМ. Продемонстрировано отсутствие проникновения частиц магнетита в головной мозг. Установлено изменение активности внутриклеточных ферментов гепатоцитов, кардиомиоцитов и нефроцитов при внутривенном введении суспензии НЧМ. Показано влияние наноразмерных частиц магнетита на активность органоспецифичных ферментов и метаболитов плазмы крови крыс. Впервые изучены окислительные свойства НЧМ и его влияние на активность антиоксидантных систем плазмы крови. Показана зависимость выраженности морфологических и биохимических изменений в организме крыс от дозы введенного магнетита.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены новые данные фундаментального характера, раскрывающие морфологические и биохимические аспекты взаимодействия наноразмерных частиц магнетита с тканями и органами крыс.

Отсутствие гибели животных, характер обнаруженных в изученных органах изменений, развитие компенсаторно-приспособительных реакций в ответ на внутривенное введение наноразмерного магнетита свидетельствует о принципиальной возможности использования наноразмерного магнетита в биомедицинских целях и открывает перспективы для создания на его основе новых лекарственных и диагностических средств. На основании результатов работы возможна разработка стратегии по преодолению или снижению повреждающего действия наноразмерных частиц магнетита на организм. Полученные данные расширяют существующие представления о токсичности нанодисперсных материалов для организма экспериментального животного.

Положения, выносимые на защиту:

1. Для стабилизации суспензии немодифицированного наноразмерного магнетита в биологических и медицинских целях пригоден водно-солевой раствор цитрата натрия, хлорида натрия и динатриевой соли 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфониевой кислоты.

2. Внутривенное введение суспензии наноразмерного магнетита вызывает морфологические изменения в печени, легком, почках, сердце и селезенке крыс.

3. Внутривенное введение суспензии наноразмерного магнетита вызывает изменение активности внутриклеточных ферментов гепатоцитов, кардиомиоцитов и нефроцитов крыс, а также активности ряда органоспецифичных ферментов, метаболитов и общей антиоксидантной активности плазмы крови крыс.

Апробация диссертации. Основные результаты работы доложены и обсуждены на IX конгрессе международной ассоциации морфологов (г. Бухара, 2008); X конгрессе с международным участием молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (г. Томск, 2009); 9-ой школе молодых ученых «Физические проблемы нанoeлектроники, нанотехнологий и микросистем» (г. Ульяновск, 2009); на научной конференции «Химическая биология - фундаментальные проблемы бионанотехнологии» (г. Новосибирск, 2009); VI съезде анатомов, гистологов и эмбриологов России (г. Саратов, 2009).

Внедрение результатов. Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре морфологии и общей патологии, биохимии и молекулярной биологии, а также патологической анатомии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 работ, 6 из которых в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 165 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, включающего 216 источника, из которых 78 отечественных и 138 зарубежных. Работа иллюстрирована 59 рисунками, 10 таблицами.

Личный вклад автора. Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на 95 беспородных крысах-самцах, массой 150 ± 30 г, из которых были сформированы 4 группы: 1-я группа (25 крыс) – интактные животные - In; 2-я группа (25 крыс) – контрольная – многократное введение стабилизирующего раствора – в хвостовую вену каждые двое суток вводили по 2 мл стабилизирующего раствора - SS; 3-я группа (25 крыс) – однократное введение суспензии магнетита – в хвостовую вену было введено 2 мл стандартизированной суспензии магнетита ($0,1 \text{ г}(\text{Fe}_3\text{O}_4)/\text{кг}_{\text{массы тела}}$) - NPU; 4-я группа (20 крыс) – многократное введение суспензии магнетита – в хвостовую вену крыс каждые двое суток вводили по 2 мл стабилизированной суспензии магнетита ($0,1 \text{ г}(\text{Fe}_3\text{O}_4)/\text{кг}_{\text{массы тела}}$) - NPR.

Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1987 г) [Горбунова Н.А., 1998] и Федерального Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г.

Из НЧМ готовили суспензию в водно-солевом стабилизирующем растворе, содержащем хлорид натрия, цитрат натрия и динатриевую соль 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфониевой кислоты. Полученную суспензию подвергали сонификации и центрифугированию, после чего супернатант

фильтровали через поликарбонатные фильтры с размером пор 100 нм под избыточным давлением аргона [Yang Z. M. et al., 2007; Gu H.W. et al., 2005].

Концентрацию магнетита в суспензии устанавливали по концентрации железа рентгено-флуоресцентным методом. Распределение частиц магнетита по размерам в суспензии устанавливали методом лазерной дифракции. Форму и структуру частиц в суспензии определяли с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Томографическое исследование внутренних органов крыс проводили на МРТ-сканере Toshiba Vantage с индукцией поля 1,5Т и на МРТ-сканере Magnetom Open с индукцией поля 0,2Т на 1 и 40 сутки после однократного введения, а также на 40 сутки после многократного внутривенного введения суспензии НЧМ.

Проводку и заливку в парафин материала для гистологического и гистохимического исследований осуществляли по Меркулову [Меркулов Г.А., 1972]. 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 окрашивались по методу Перлса, после чего докрашивались гематоксилином и эозином по Саркисову [Саркисов В.М., 2002]. На гистологических препаратах печени и легкого подсчитывали общее количество Перлс-позитивных макрофагов, с последующим пересчетом на 1 мм² ткани соответствующего органа [Автандилов Г.Г., 1990]. Гистоэнзимологическое исследование активности сукцинатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, НАДН₂- и НАДФН₂-тетразолий редуктаз в гепатоцитах, нефроцитах и кардиомиоцитах крыс проводили в соответствии с рекомендациями З. Лойды и соавт. [Лойда З. и др., 1982; James J., 1986]. Гистохимическое выявление гликогена в гепатоцитах и кардиомиоцитах производили путем постановки ШИК (PAS)-реакции по МакМанусу и Хочкиссу (контроль с амилазой) [Суходоло И.В., 1990; Кудрявцев Б.Н., 1979].

Количественную оценку активности ферментов и содержания гликогена производили на микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ в проходящем свете, длина волны 546 нм и 590 нм, соответственно, зонд площадью 0,5 мкм². Оптическую плотность измеряли не менее чем в 50 клетках препарата и выражали в условных единицах оптической плотности.

Электронномикроскопическое исследование печени крыс проводили на 1 и 40 сутки после однократного (0,1г_{(Fe₃O₄)/кг_{массы тела}) внутривенного введения (3-я группа, NPU), а также на 40 сутки (суммарная доза 2г_{(Fe₃O₄)/кг_{массы тела}) у животных с многократным внутривенным введением суспензии НЧМ (4-я группа, NPR). Фрагменты печени (V≈1мм³) фиксировали в 4% параформальдегиде на буфере Хэнкса (рН 7,4) в течение 24 ч при 4°С, затем в 1% OsO₄ на том же буфере в течение 3 ч при 4°С. Обезвоживали и заливали в смесь эпон-аралдит. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали 1% раствором толуидинового синего в насыщенном растворе буры [Уикли Б., 1975]. Ультратонкие срезы помещали на сетки, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, после чего просматривали на электронном}}

микроскопе JEM-100 CX II, JEOL и фотографировали при увеличении 3600, 7200 и 48000.

В плазме крови определяли активность ряда органоспецифичных ферментов: аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), γ -глутамилтрансферазы (γ -ГТ), креатинфосфокиназы (КФК), креатинфосфокиназы МВ (КФК-МВ) лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гидроксibuтиратдегидрогеназы (ГБДГ), а также концентрацию мочевины, креатинина, общего и прямого билирубина на автоматическом биохимическом анализаторе Hitachi-911 с использованием реактивов фирм: «Вектор-БЕСТ», «Bioson», «Chronolab», «СКНАС-activated».

Содержание радикалов в плазме крови животных и общую антиоксидантную активность плазмы определяли хемилюминесцентным методом с помощью полуавтоматического люминометра (Lumat LB 9507). Об общей антиоксидантной активности плазмы крови крыс судили по снижению интенсивности люминол-зависимой хемилюминисценции в пробе через 1 минуту относительно исходных значений хемилюминисценции пробы.

Статистическая обработка результатов производилась с помощью статистического пакета «SPSS 11.5». Результаты представлены в виде средней, ошибки средней и стандартного отклонения ($X \pm m$). Распределение на соответствие нормальному проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилкса. Для выяснения достоверности различий средних значений морфометрических, гистохимических и биохимических показателей между экспериментальными группами, использовали t-тест для независимых выборок (тест Стьюдента) и t-тест для зависимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основной проблемой использования наноматериалов в медицинских и биологических исследованиях является получение стабильной суспензии [Gupta A.K. et al., 2005; Арсентьева И.П. и др., 2007]. Проблема подбора стабилизатора еще актуальнее в биологических исследованиях, так как помимо стабилизирующего эффекта его компоненты не должны обладать повреждающим действием на биологические структуры и молекулы [Bruce I.J. et al., 2005; Chan D.C.F. et al., 1993].

Из всех исследованных нами стабилизирующих систем (олеиновая кислота, растительные полисахариды, цитрат натрия, физиологический раствор) для дальнейшего исследования был выбран водно-солевой раствор на основе цитрата натрия, хлорида натрия и динатриевой соли 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфониевой кислоты (ГЭПЭС). Ионы цитрата и хлорида натрия, сорбируясь на поверхности НЧМ, придают им электростатический и стерический факторы стабильности. ГЭПЭС, как компонент стабилизирующего раствора, обеспечивает буферные свойства последнего (рН 7,4) [Левитин Е.Я. и др., 1998; Martina M.S. et al., 2005].

По данным электронной микроскопии отдельные частицы магнетита в приготовленной нами суспензии имеют сферическую форму и располагаются в виде свободных частиц и агломератов. Максимальный размер свободных

частиц составляет 30 нм, размер агломератов частиц не превышает 100 нм.

Для выявления эффектов и последствий введения магнетита на организм крыс брали максимально достижимую концентрацию НЧМ. Для данного стабилизирующего раствора и используемых НЧМ концентрация 7 мг(Fe₃O₄)/мл(стаб. раствора) является максимальной. Дальнейшее увеличение концентрации наноразмерных частиц вызывает снижение седиментационной устойчивости суспензии.

Для визуализации распределения НЧМ в организме крыс после внутривенного введения суспензии использовали МРТ исследование. МРТ исследование не выявило различий в структуре внутренних органов у животных интактной (In) и контрольной (SS) групп. На томограммах крыс через сутки после однократного введения суспензии НЧМ (3-я группа, NPR) отмечается искажение сигнала в области эпигастрия, что объясняется накоплением магнетита в печени и селезенке. К 40 суткам после однократного внутривенного введения суспензии НЧМ наблюдали нормализацию качества изображения, что характеризует наличие механизмов элиминации наноразмерного магнетита из организма крыс.

На 40 сутки после многократного внутривенного введения (NPR, 4-я группа) наблюдается значительное искажение сигнала в области эпигастрия, которое распространяется на грудную полость и нижние этажи брюшной полости.

Более существенное накопление НЧМ в печени и селезенке крыс на 40 сутки после многократного внутривенного введения (NPR, 4-я группа) объясняется большей, в сравнении с однократным введением, суммарной дозой магнетита (2Г(Fe₃O₄)/кг_{массы тела}).

Структура печени, легкого, почек, селезенки, сердца и мозга животных после внутривенного введения стабилизирующего раствора (SS, 2-ая группа) имеет обычное строение и не отличается от таковой интактных крыс (In, 1-ая группа) в аналогичные сроки. Кроме того, реакция Перлса на препаратах печени, легкого, мозга, почек и сердца животных 1-ой и 2-ой групп была отрицательной.

После однократного внутривенного введения суспензии НЧМ (3-я группа, NPU) в печени животных наблюдали комплекс дисциркуляторных расстройств (полнокровие синусоидов, гиперемия центральных и междольковых вен, перипортальный отек), свидетельствующий о существенных нарушениях гемодинамических параметров органа. Начиная с 14 суток, выраженность морфологических изменений в печени снижается. Вероятно, к 14 суткам организм крыс элиминирует основное количество введенного наноматериала, а компенсаторно-приспособительные реакции, возникшие в ответ на его введение достигают максимального развития. Нормализация структуры печени к 40 суткам после однократного введения наноразмерного магнетита позволяет говорить о её способности к восстановлению, наличии механизмов элиминации НЧМ и о широких компенсаторных возможностях этого органа [Гулак П.В. и др., 1985; Логинов А.С. и др., 1985]. В печени животных после многократного внутривенного введения наноразмерных частиц (4-я группа, NPR) к описанным

выше дисциркуляторным изменениям, которые сохраняются в течение всего срока эксперимента, с 14 суток присоединяются органические повреждения паренхимы, проявляющиеся моноцеллюлярными некрозами. Кроме того, наблюдали накопление наноразмерных частиц магнетита в клетках Купфера, которые располагались перисинусоидально, а в поздние сроки скапливались перипортально. Скопление Перлс-позитивных клеток Купфера [van Til N.P. et al., 2005] перипортально и в области триад свидетельствует об их миграции от синусоидов к желчевыводящим путям порталных трактов с последующим проникновением в их просвет. Благодаря способности к активному движению, клетки Купфера могут эвакуироваться из организма путем миграции в просвет желчевыводящей системы. Эта способность клеток системы МНФ определяет основной механизм выведения наноразмерных частиц из организма [Карр Я., 1978; Kostarelou K. et al., 2007; Nishimori H. et al., 2009].

В легких животных как после однократного (3-я группа, NPU), так и после многократного (4-я группа, NPR) внутривенного введения наноразмерных частиц магнетита наблюдали только гемодинамические нарушения, проявляющиеся расширением межальвеолярных перегородок, гиперемией вен и микроциркуляторного русла, спазмом артерий, отёком интерстициальной соединительной ткани. Компенсаторно-приспособительные реакции в легком после однократного внутривенного введения суспензии НЧМ (3-я группа, NPU) достигают максимального развития к 14 суткам. К 21 суткам происходит полная нормализация структуры органа. Выраженность и распространенность гемодинамических расстройств в легких животных после многократного внутривенного введения наноразмерного магнетита (4-я группа, NPR) снижается к 40 суткам. Наноразмерные частицы магнетита накапливаются в альвеолярных макрофагах. Перлс-позитивные клетки располагаются в межальвеолярных перегородках – рис. 1. Начиная с 7 суток Перлс-позитивные альвеолярные макрофаги начинают кумулироваться перибронхиально и перибронхиолярно, что свидетельствует о начале активного выхода клеток в просвет бронхиального дерева [Brown J.S. et al., 2002; Utell M.J. et al., 2000] и элиминации наноразмерных частиц [Dong Q. et al., 1998; Peters A. et al., 1997].

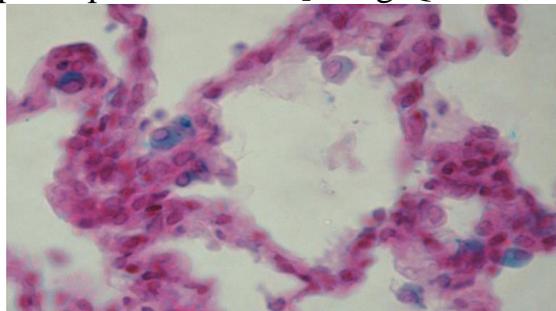


Рис.1. Легкое крысы после однократного внутривенного введения суспензии магнетита. Перлс-позитивные альвеолярные макрофаги в межальвеолярных перегородках и в просвете альвеол. Ув. 200. Окр.: реакция Перлса с докраской гематоксилином и эозином.

В почках животных после однократного (3-я группа, NPU) внутривенного введения наноразмерных частиц магнетита выявляли лишь гемодинамические нарушения (полнокровие капилляров клубочка, расширение просвета капсулы Шумлянско-Боумана, полнокровие вен мозгового вещества, отек стромы), которые проходят к концу эксперимента. В группе с многократным внутривенным введением, к описанным гемодинамическим изменениям присоединяются, начиная с 7 суток, органические повреждения, проявляющиеся некрозом нефроцитов проксимальных извитых канальцев. К 40 суткам морфологические изменения в почках после многократного введения магнетита выражены слабо, что свидетельствует о полной реализации адаптационно-приспособительных механизмов.

Слабоположительная реакция Перлса в почках крыс объясняется относительно слабым развитием системы МНФ в этом органе, а также выведением наноматериала иными путями, например, фильтрацией или секрецией. Наличие наноразмерных частиц титана в моче крыс после внутривенного введения показано в работе Guzman et al. [Guzman M. et al., 2000].

В селезенке животных после однократного (3-я группа, NPU) и многократного (4-я группа, NPR) внутривенного введения наноразмерных частиц магнетита наблюдали незначительные дисциркуляторные нарушения, возникающие в ранние сроки. Обращает на себя внимание значительное накопление в макрофагах органа наноразмерных частиц магнетита. Отсутствие выраженных повреждений паренхимы при относительно высоком содержании Перлс-позитивного материала свидетельствует о широких компенсаторных возможностях этого органа. Селезенка активно участвует в элиминации НЧМ из системной циркуляции, используя развитую систему МНФ и, таким образом, играет существенную роль в снижении их концентрации в крови. Селезенка оказывает системный протективный эффект, защищая другие органы от воздействия наноматериала, которое может привести к серьезным нарушениям и непредсказуемым последствиям [Demoy M. et al., 1999]. Положительную реакцию Перлса в селезенке крыс интактной и контрольных групп можно объяснить активным участием последней в метаболизме железа в организме. Селезеночные макрофаги, вовлеченные в процесс утилизации стареющих эритроцитов, накапливают железо в своей цитоплазме в форме гемосидерина [Мецлер Д., 1980].

В сердце крыс после однократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц во все исследованные сроки наблюдали лишь дисциркуляторные изменения и незначительное количество (вплоть до полного отсутствия) Перлс-позитивных клеток. Это свидетельствует о том, что сердце активно не участвует в фармакокинетике НЧМ. В группе с многократным внутривенным введением суспензии наноразмерного магнетита дисциркуляторные изменения прогрессируют к 40 суткам, а, начиная с 21 суток, возникают единичные некрозы кардиомиоцитов.

В нашем исследовании после однократного и многократного внутривенного введения НЧМ не обнаружено их проникновения в мозг и каких-либо морфологических изменений в нем, исключая легкие гемодинамические расстройства. Принципиальная возможность проникновения частиц титана в мозг показана в работах [Mykhaylyk O. et al., 2001; Oberdorster G. et al., 2004]. Отсутствие морфологически выявляемых изменений в мозге свидетельствует о непроницаемости для НЧМ гемато-энцефалического барьера. Даже при значительном увеличении дозы вводимого наноматериала обнаружения и накопления его в мозге не происходит [Kreuter J., 2004; Lockman P.R. et al., 2004].

Морфологические изменения в изученных органах после многократного внутривенного введения суспензии НЧМ (4-я группа, NPR) проявляются теми же типовыми патологическими процессами, что и в группе с однократным введением суспензии магнетита (3-я группа, NPU). Развитие компенсаторно-приспособительных реакций у животных 4-ой группы, в сравнении с 3-ей группой (NPU), задерживается, что, вероятно, обусловлено влиянием НЧМ вследствие их регулярного введения (каждые 2 суток) и проявляется наличием морфологических изменений на всем протяжении эксперимента.

Изменения в изученных органах могут являться как результатом непосредственного действия наноразмерных частиц на клетки органов, так и опосредованного (например, нарушение микроциркуляции, за счет эмболии сосудов микроциркуляторного русла агрегатами наноразмерных частиц; внутрисосудистая или внутриклеточная активация свободно радикальных процессов; инициация освобождения медиаторов клетками, участвующими в элиминации наноразмерных частиц и т.д.), которые вызывают ишемическую, токсическую или рецептор-опосредованную гибель клеток [Curtis A., 2003; Salata O.V., 2004; Worm P. et al., 2006].

Для морфометрического исследования использовали печень и легкое, так как именно в этих органах были обнаружены наиболее выраженные морфологические изменения и значительное накопление частиц магнетита. Селезенку, несмотря на выраженную реакцию Перлса, морфометрическому исследованию не подвергали, из-за отсутствия возможности дифференцировки макрофагов, содержащих эндогенное железо от макрофагов, содержащих железо, входящее в состав магнетита; помимо этого в селезенке нами не обнаружено существенных морфологических изменений, вызванных пребыванием в ней наноразмерных частиц. В сердце и почках реакция Перлса была выражена слабо. Мозг не исследовался вследствие отсутствия в нем Перлс-позитивных клеток во все сроки эксперимента.

В срезах печени и легкого подсчитывали общее количество Перлс-позитивных клеток, а также количество их отдельных классов.

Клетки системы МНФ исследованных органов, в зависимости от количества Перлс-позитивных гранул в их цитоплазме, можно разделить на 3 класса:

1 класс – мононуклеарные фагоциты, цитоплазма которых переполнена Перлс-позитивными гранулами.

2 класс - мононуклеарные фагоциты умеренно нагруженные Перлс-позитивными гранулами.

3 класс - мононуклеарные фагоциты, имеющие единичные Перлс-позитивные гранулы.

В печени и легком интактных и контрольных крыс Перлс-позитивные клетки не визуализируются.

При однократном и многократном введении суспензии наноразмерных частиц наблюдается достоверное снижение общего количества Перлс-позитивных клеток в печени к концу эксперимента.

В группе крыс после однократного введения магнетита также отмечается снижение количества Перлс-позитивных клеток всех трех классов к 40 суткам. После многократного внутривенного введения суспензии магнетита наблюдается снижение к 40 суткам количества Перлс-позитивных клеток 2 и 3 классов и увеличение количества клеток, цитоплазма которых переполнена гранулами магнетита (1 класс). Отсутствие увеличения количества клеток с единичными гранулами свидетельствует о полном вовлечении системы МНФ печени в процесс поглощения НЧМ [Vallyathan V. et al., 1992; Kim J. et al., 2006]. Увеличение же количества клеток 1 класса к 40 суткам объясняется переходом в него клеток 2 и 3 классов по мере накопления наноразмерного материала – рис.2.

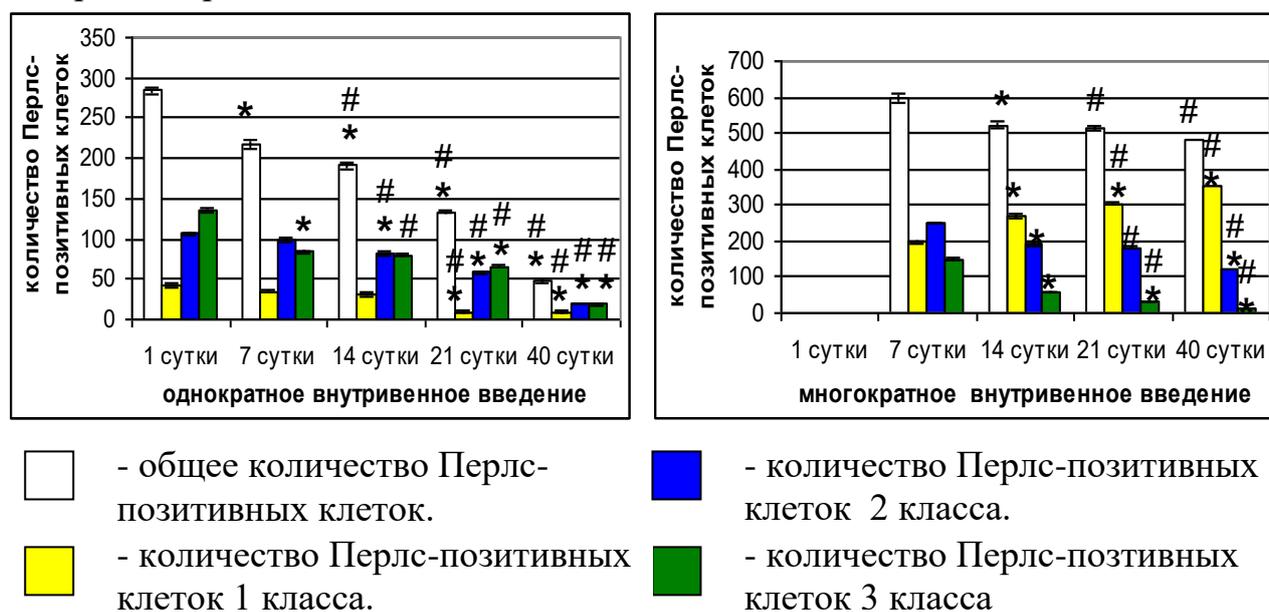


Рис.2. Динамика количества Перлс-позитивных клеток в печени крыс после внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита.

* - статистически достоверное отличие среднего количества клеток от среднего в предыдущий срок ($p < 0,05$).

- статистически достоверное отличие среднего количества клеток от среднего на 1 сутки для однократного и на 7 сутки для многократного введения ($p < 0,05$).

В легком крыс как после однократного, так и после многократного внутривенного введения происходит снижение общего количества и количества Перлс-позитивных клеток отдельных классов к концу эксперимента.

Снижение количества Перлс-позитивных макрофагов в печени и легком после однократного (3-я группа, NPU) и многократного (4-я группа, NPR) введения к 40 суткам свидетельствует о наличии в них механизмов выведения наноразмерных частиц [Decker K. et al., 1990; Hardonk M.J. et al., 1992; van Til N.P. et al., 2005; Peters A. et al., 1997; Kim J. et al., 2006; Zhang Y. et al., 2002].

Ультраструктурное исследование печени крыс подтвердило накопление частиц магнетита в клетках Купфера. В цитоплазме клеток Купфера через 1 сутки после однократного внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита повсеместно выявляются гранулы диаметром до 1,5 мкм, содержащие магнетит и окруженные биологической мембраной. Наличие биологической мембраны, окружающей гранулы в клетках Купфера, свидетельствует о проникновении НЧМ в клетку механизмом фагоцитоза, с формированием фагосом. Гранулы, в зависимости от количества содержащихся в них НЧМ и характера их распределения, можно разделить на:

1. Электронноплотные гранулы, заполненные НЧМ и их агрегатами, которые лежат компактно, плотно прилегая друг к другу.
2. Гранулы, содержащие умеренное количество НЧМ, частицы и агрегаты в которых лежат более разреженно, чем в описанных выше, встречаются места вовсе свободные от зерен магнетита, определяется морфология отдельных частиц.
3. Полые гранулы, которые содержат незначительное количество НЧМ и их агрегатов. На электроннограммах выглядят как светлые, окруженные мембраной структуры.

Преобладание в клетках Купфера электронноплотных гранул на 1 сутки после внутривенного введения суспензии 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. Свободно лежащих в цитоплазме клеток Купфера частиц магнетита и их агрегатов не обнаружено.

К 40 суткам наблюдается изменение ультраструктуры гранул, проявляющееся уменьшением содержания в них частиц магнетита и, как следствие, уменьшением их электронной плотности. Количество гранул представляется сниженным в сравнении с 1 сутками.

В просвете синусоидов после многократного внутривенного введения суспензии НЧМ на 40 сутки ($2\text{г}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{кг}_{\text{массы тела}}$) выявляются частицы магнетита и их агрегаты. Гранулы клеток Купфера окружены биологической мембраной и содержатся в количестве не менее 50 на клетку. Среди гранул преобладают электронноплотные гранулы, полностью заполненные частицами магнетита и их агрегатами, которые лежат очень компактно – рис. 3.

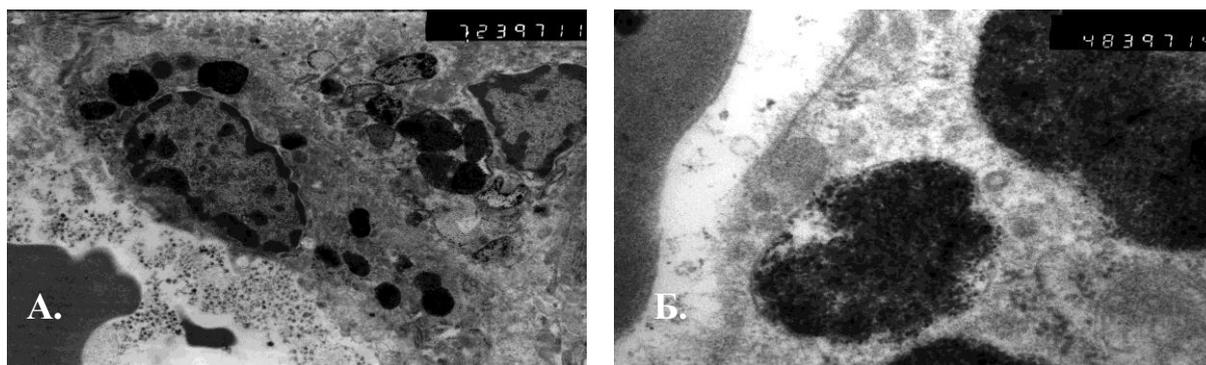


Рис.3. Печень крысы на 40 сутки после многократного внутривенного введения суспензии магнетита. А. Клетка Купфера, содержащая электронноплотные гранулы, в просвете синусоида – наноразмерные частицы магнетита, Ув. 7200. Б. Гранулы клетки Купфера полностью заполненные наноразмерными частицами магнетита, окруженные биологической мембраной, Ув. 48000.

Наличие морфологических изменений в изучаемых органах крыс 3 (NPU) и 4 (NPR) групп при отсутствии изменений в группах интактных (In, 1-я группа) и контрольных (SS, 2-я группа) животных свидетельствует о том, что эти изменения обусловлены влиянием НЧМ. Схожесть морфологических изменений в органах животных этих двух групп объясняется общностью воздействующего фактора - частицами магнетита. Разная же степень выраженности реакции в двух опытных группах определяется дозой введенного магнетита.

С целью выявления функциональных изменений во внутренних органах, вызванных внутривенным введением суспензии НЧМ, нами проведено гистоэнзимологическое исследование печени, сердца и почек крыс.

Раствор-стабилизатор, использованный в работе, не влияет на активность внутриклеточных ферментов гепатоцитов, кардиомиоцитов и эпителиоцитов проксимальных извитых канальцев почек, а также на содержание гликогена в гепатоцитах и кардиомиоцитах крыс.

Однократное внутривенное введение суспензии НЧМ не вызывает изменений внутриклеточной активности сукцинатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, НАДН₂- и НАДФН₂-тетразолий редуктаз гепатоцитов и нефроцитов извитых канальцев первого порядка, а также не влияет на содержание гликогена в гепатоцитах и кардиомиоцитах крыс.

Изменения активности внутриклеточных ферментов гепатоцитов развиваются лишь после многократного введения суспензии магнетита и суммарной дозе не менее $300 \text{ мг}_{(\text{Fe}_3\text{O}_4)}/\text{кг}_{\text{массы тела}}$, что объясняется достаточно большим компенсаторным резервом этого органа – рис.4. Снижение активности пиридинзависимых дегидрогеназ свидетельствует о замедлении энергетического метаболизма и снижении восстановительного синтеза в цитозоле.

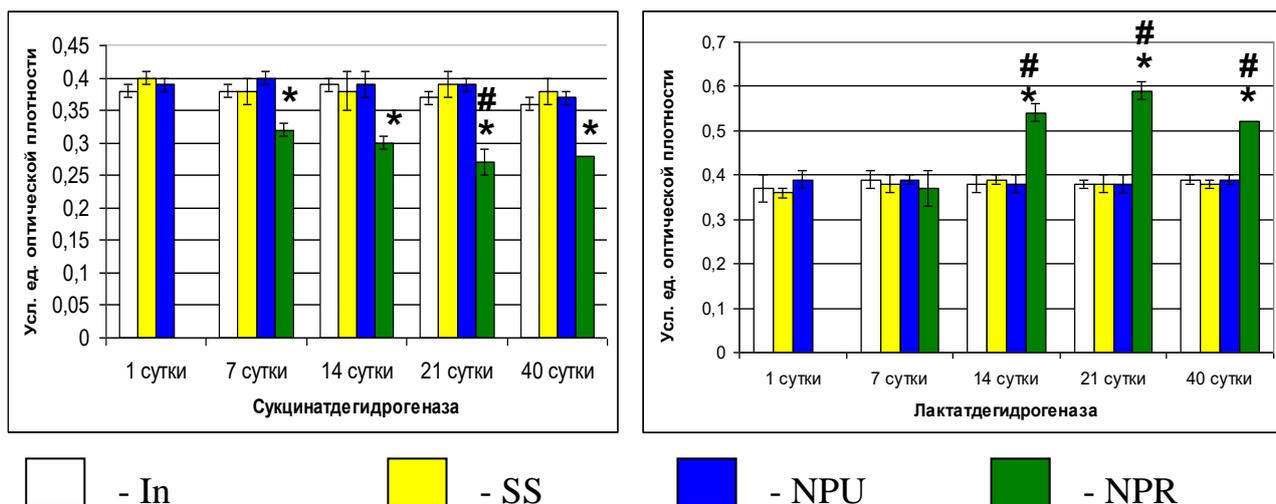


Рис.4.Динамика внутриклеточной активности СДГ и ЛДГ в гепатоцитах крыс исследованных групп.

* - статистически достоверное отличие параметра от соответствующего показателя животных интактной группы ($p < 0,05$).

#- статистически достоверное отличие параметра относительно его величины на 1 сутки для группы с однократным (NPU) или относительно его величины на 7 сутки для группы с многократным (NPR) внутривенным введением суспензии наноразмерных частиц магнетита ($p < 0,05$).

Снижение активности СДГ и увеличение активности ЛДГ в гепатоцитах крыс 4 группы начинается с 7 суток и прогрессирует к 40 суткам, что свидетельствует о влиянии НЧМ на энергетический метаболизм клетки, вызывая его смещение в сторону анаэробных реакций. Это подтверждается сопутствующим снижением содержания гликогена в гепатоцитах крыс.

В кардиомиоцитах крыс после однократного внутривенного введения суспензии магнетита активность СДГ кратковременно повышается (1 сутки) после чего нормализуется к 14 суткам, тогда как активность ЛДГ снижается к 1 суткам после внутривенной инъекции и восстанавливается к 7 суткам. Смещение энергетического метаболизма в кардиомиоцитах в сторону аэробных реакций ведет к повышению эффективности использования субстратов окисления. Нормализация активности СДГ и ЛДГ в кардиомиоцитах к 7 и 14 суткам, соответственно, объясняется выведением основного количества магнетита. Характер изменений активности СДГ и ЛДГ в кардиомиоцитах после многократного внутривенного введения НЧМ совпадает с таковым при однократном введении, однако, эти изменения сохраняется на протяжении всего эксперимента и нарастают при увеличении суммарной дозы магнетита.

Содержание гликогена в кардиомиоцитах крыс нарастает к 40 суткам, что хорошо согласуется с экспериментальными данными о снижении активности ЛДГ и подтверждает гипотезу об активации аэробных механизмов.

Повышение активности СДГ в эпителиоцитах проксимальных извитых канальцах почки после многократного внутривенного введения суспензии магнетита наблюдается с 7 суток. На фоне постоянного введения магнетита у

животных этой группы, вероятно, активируются процессы фильтрации для обеспечения элиминации НЧМ из циркуляции. Усиление фильтрации неизбежно ведет к активации процессов реабсорбции и секреции, для протекания которых необходима энергия АТФ. Повышенная потребность в АТФ обеспечивается активацией цикла Кребса [Guzman M. et al., 2000]. Расходование АТФ для обеспечения и интенсификации работы транспортных механизмов ведет к угнетению биосинтетических процессов в цитозоле [Албертс Б., 1993], что подтверждается снижением активности НАДФН₂- и НАДН₂-тетразолий редуктазы.

Таким образом, можно предположить, что НЧМ потенцируют тот тип энергетического метаболизма, который характерен для определенного типа клеток [Козлов В.А., 1995; Уайт А. и др., 1981]. Наноразмерные материалы могут непосредственно влиять на активность внутриклеточных ферментов после проникновения внутрь клетки [Yang Z. M. et al., 2007], так в литературе имеются данные по влиянию наноразмерных материалов на активность ряда ферментов [Koneracka M. et al., 2002; Koneracka M. et al., 1999; Liao M.-H. et al., 2001; Hong J. et al., 2007].

Следует отметить, что после однократного внутривенного введения суспензии магнетита к концу эксперимента активность ферментов возвращается к величинам, свойственным интактным животным, тогда как при многократном введении этот эффект сохраняется в течение всего эксперимента. Выведение магнетита из организма ведет к нормализации параметров активности ферментов энергетического метаболизма.

Многократное внутривенное введение стабилизирующего раствора не влияет на активность исследованных органоспецифичных ферментов и концентрации метаболитов в плазме крови крыс, отражающих их функциональное состояние.

Внутривенное введение суспензии НЧМ вызывает повышение активности кардиоспецифичных (КФК, КФК-МВ, ЛДГ, ГБДГ, АсАТ) и гепатоспецифичных (АлАТ, ЩФ, γ -ГТ) ферментов плазмы крови крыс, которое сохраняется в течение всего срока эксперимента. Изменения активности ферментов в плазме крови крыс после многократного внутривенного введения суспензии НЧМ (4-я группа, NPR) более выражены, в сравнении с животными, получившими однократную инъекцию суспензии магнетита (3-я группа, NPU).

Повышение активности аланинаминотрансферазы - рис. 5 - и аспартат-аминотрансферазы у крыс после внутривенного введения суспензии НЧМ связано с повреждением паренхимы печени и/или кардиомиоцитов, которое проявляется уже после однократного введения НЧМ (3-я группа, NPU).

Повышение активности щелочной фосфатазы - рис. 5 - в плазме крови животных с внутривенным введением НЧМ, вероятно, является следствием повреждения эпителия желчевыводящих путей и кишечника, вызванного экскрецией НЧМ в просвет желудочно-кишечного тракта в составе жёлчи [Jani P.U. et al., 1994].

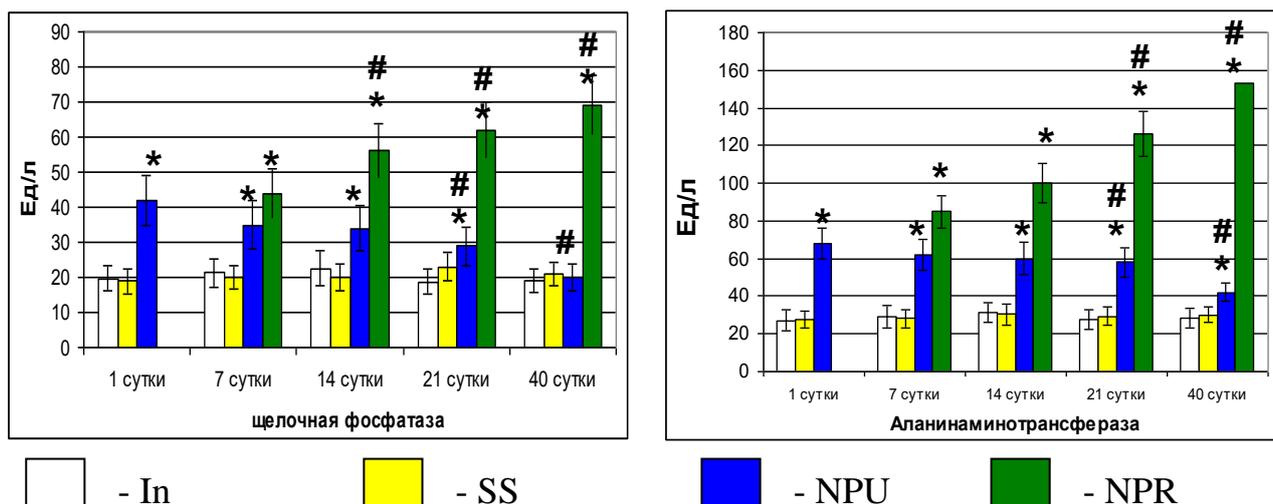


Рис.5. Динамика активности гепатоспецифичных ферментов плазмы крови крыс исследованных групп.

* - статистически достоверное отличие параметра от соответствующего показателя животных интактной группы ($p < 0,05$).

#- статистически достоверное отличие параметра относительно его величины на 1 сутки для группы с однократным (NPU) или относительно его величины на 7 сутки для группы с многократным (NPR) внутривенным введением суспензии наноразмерных частиц магнетита ($p < 0,05$).

Нормализация активности аминотрансфераз и щелочной фосфатазы после однократного внутривенного введения суспензии НЧМ к 40 суткам, может быть объяснена выведением большей части первоначально введенной дозы магнетита и восстановлением паренхимы печени и слизистой желчевыводящих путей.

Повышение активности γ -глутамилтрансферазы у животных на фоне внутривенного введения суспензии НЧМ можно объяснить повреждением гепатоцитов и нефроцитов.

Повышение активности лактатдегидрогеназы у крыс после внутривенного введения суспензии НЧМ определяется повреждением гепатоцитов, кардиомиоцитов и нефроцитов.

Повышение активности гидроксибутиратдегидрогеназы (ГБДГ, ЛДГ1) в плазме крови крыс характеризует повреждение миокарда и вносит вклад в повышение общей активности лактатдегидрогеназы.

Вместе с другими кардиоспецифическими маркерами повышение активности КФК-МВ свидетельствует о повреждении миокарда на фоне внутривенного введения НЧМ. Однонаправленное изменение и идентичная динамика изменения активности КФК и КФК-МВ после внутривенного введения НЧМ позволяет утверждать, что повышение активности КФК обеспечивается за счет увеличения активности ее сердечной изоформы и однозначно свидетельствует о повреждении сердечной мышцы [Зайцев С.Ю., 2005].

Изменения концентрации креатинина, мочевины, общего и прямого билирубина в плазме крови, характеризующие почек и печени животных при однократном введении суспензии магнетита обратимы и нормализуются к 40 суткам, тогда как при многократном введении магнетита эти нарушения прогрессируют к концу эксперимента.

В исследовании повышение концентрации общего билирубина в плазме крови крыс после внутривенного введения суспензии НЧМ может быть связано:

- а) с повреждением паренхимы печени, которое сопровождается снижением интенсивности его выведения;
- б) с активацией метаболизма клеток МНФ НЧМ, что ведет к усилению синтеза предшественников билирубина;
- в) с нарушением его транспорта в печень.

Вследствие повреждения клеток печени, гепатоциты не способны осуществлять синтез прямого билирубина, этим объясняется высокий уровень в плазме крови непрямого билирубина [Карпищенко А.И. и др., 2002; Рогожин В.В. и др., 2009]. Концентрация прямого билирубина кратковременно снижается в ранние сроки после однократного введения суспензии магнетита и восстанавливается к концу эксперимента, что свидетельствует о восстановлении паренхимы печени по мере выведения НЧМ. Однако, при многократном введении магнетита концентрация прямого билирубина снижается, а начиная с 21 суток не определяется.

Увеличение концентрации мочевины в плазме крови крыс после внутривенного введения НЧМ можно объяснить деструктивными изменениями в органах (почка, печень, сердце), которые сопровождаются распадом белка и снижением мочевыделительной функции почек.

Увеличение концентрации креатинина в плазме крови также свидетельствует о повреждении почек [Зайцев С.Ю. и др., 2005; Меньшикова В.В. и др., 2002].

Выведение НЧМ протекает наиболее интенсивно в первую неделю после внутривенной инъекции [Liu W.-T., 2006; Jordan A. et al., 1997; Thomas K. et al., 2005; Moore A. et al., 2001], именно этим объясняется значительное увеличение активности ферментов и концентрации метаболитов плазмы крови на начальных сроках эксперимента.

Результаты биохимического исследования плазмы крови хорошо согласуются с результатами морфологического исследования печени, почек и сердца крыс после внутривенного введения НЧМ, как после однократного (3-я группа, NPU), так и после многократного введения (4-я группа, NPR). Морфологическое исследование печени, почек и сердца крыс выявило более значительные изменения в этих органах после многократного внутривенного введения суспензии НЧМ (4-я группа, NPR), что сопровождается более сильным отклонением биохимических показателей плазмы крови крыс от соответствующих величин животных интактной группы.

Ввиду того, что железо обладает как про- так и антиоксидантными свойствами в работе исследовали влияние НЧМ на содержание свободных радикалов и общую антиоксидантную активность плазмы крови крыс.

Стабилизирующий раствор не влияет на содержание свободных радикалов и общую антиоксидантную активность плазмы крови крыс (2-я группа, SS), что объясняется отсутствием в его составе веществ, способных инициировать цепные окислительные процессы.

Динамика увеличения содержания свободных радикалов в плазме крови крыс после внутривенного введения суспензии НЧМ относительно аналогичных показателей плазмы крови животных интактной группы объясняется участием магнетита в инициации свободно радикальных процессов [Nel A. et al, 2006; Rosi N.L. et al., 2005].

После однократного внутривенного введения НЧМ (3-я группа, NPU) содержание свободных радикалов в плазме крови крыс кратковременно повышается в ранние сроки и снижается к 40 суткам, что объясняется его выведением магнетита из организма. Увеличение содержания радикалов в плазме крови крыс после многократного введения суспензии НЧМ (4-я группа, NPR) сопутствует нарастанию суммарной дозы магнетита и прогрессирует с увеличением срока эксперимента. Таким образом, прослеживается связь между содержанием радикалов в плазме крови крыс и концентрацией внутривенно введенного магнетита – рис.6.

Увеличение содержания свободных радикалов в плазме крови на фоне введения в пробу прооксидантов (индуцированная хемилюминесценция) после однократного и многократного внутривенного введения наноразмерного магнетита свидетельствует о том, что магнетит является источником дополнительных радикалов.

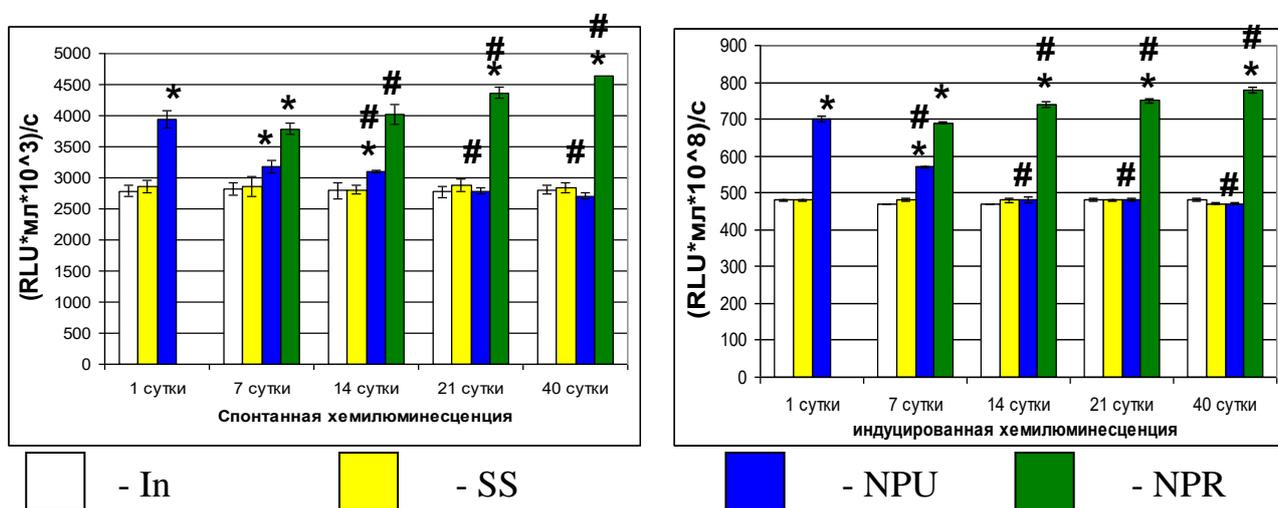


Рис.6. Динамика содержания свободных радикалов в плазме крови крыс исследованных групп.

* - статистически достоверное отличие параметра от соответствующего показателя животных интактной группы ($p < 0,05$).

#- статистически достоверное отличие параметра относительно его величины на 1 сутки для группы с однократным (NPU) или относительно его величины на 7 сутки для группы с многократным (NPR) внутривенным введением суспензии наноразмерных частиц магнетита ($p < 0,05$).

Однократное внутривенное введение суспензии НЧМ (3-я группа, NPU) вызывает повышение общей антиоксидантной активности (спонтанная антиоксидантная активность) плазмы крови в ранние сроки после инъекции, которая нормализуется по мере выведения магнетита к 14 суткам. В группе с многократным внутривенным введением магнетита (4-я группа, NPR) общая антиоксидантная активность увеличивается к 40 суткам – рис.7.

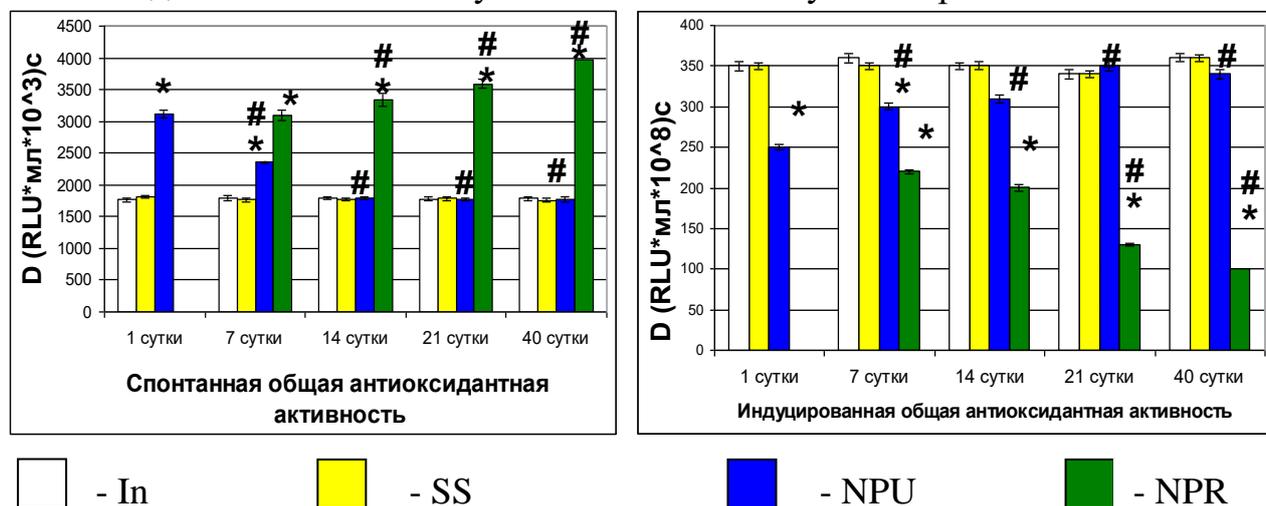


Рис.7. Динамика общей антиоксидантной активности плазмы крови крыс исследованных групп.

* - статистически достоверное отличие параметра от соответствующего показателя животных интактной группы ($p < 0,05$).

#- статистически достоверное отличие параметра относительно его величины на 1 сутки для группы с однократным (NPU) или относительно его величины на 7 суток для группы с многократным (NPR) внутривенным введением суспензии наноразмерных частиц магнетита ($p < 0,05$).

Повышение общей антиоксидантной активности плазмы крови крыс может быть обусловлено как неспецифической активацией антиоксидантных систем плазмы в ответ на введение наноматериала, обладающего прооксидантными свойствами, так и протективным или активирующим влиянием НЧМ на ферменты биологических антиоксидантных систем при их взаимодействии [Артемьева Ю.С. и др., 2005; Koneracka M. et al., 1999; Kouassi G.K. et al., 2005].

С целью выяснения механизма усиления антиоксидантной активности плазмы крови животных после внутривенного введения суспензии НЧМ, нами была определена общая антиоксидантная активность (индуцированная общая антиоксидантная активность) плазмы крови крыс на фоне введения в пробу прооксидантов (сульфат железа(II) и перекись водорода).

Добавление в пробу прооксидантов вызывает полную активацию системы антиоксидантной защиты плазмы и сводит к минимуму её антиоксидантный резерв. Дальнейшее усиление антиоксидантных свойств плазмы может произойти только при добавлении антиоксидантов извне. Наблюдаемое в эксперименте снижение индуцированной общей антиоксидантной активности на 1 сутки после однократного введения суспензии НЧМ и её нормализация к

40 суткам характеризует отсутствие каких-либо антиоксидантных свойств у частиц магнетита. Это подтверждается снижением индуцированной общей антиоксидантной активности при многократном введении магнетита к концу эксперимента по мере увеличения его суммарной дозы.

Таким образом, НЧМ обладают прооксидантными свойствами. Прооксидантные свойства магнетита проявляются сильнее с увеличением дозы. Усиление естественных антиоксидантных систем плазмы, сопровождающее внутривенное введение магнетита, объясняется компенсаторной активацией систем антиоксидантной защиты плазмы в ответ на усиление в ней свободнорадикальных процессов.

Итак, внутривенное введение суспензии немодифицированного наноразмерного магнетита вызывает в изученных органах комплекс морфологических и метаболических изменений, которые носят компенсаторно-приспособительный характер.

Выводы

1. Стабилизирующий водно-солевой раствор, используемый для приготовления суспензии наноразмерного магнетита при внутривенном введении не оказывает повреждающего действия на организм крыс и обеспечивает поддержание необходимых физико-химических параметров суспензии.
2. Внутривенное введение суспензии наноразмерного магнетита сопровождается накоплением его частиц в клетках системы мононуклеарных фагоцитов печени, селезенки, легкого, почек и сердца, а также дисциркуляторными расстройствами и очаговыми дистрофическими и некротическими изменениями паренхимы этих органов.
3. Многократное внутривенное введение суспензии наноразмерных частиц магнетита сопровождается изменениями энергетического и пластического метаболизма гепатоцитов, кардиомиоцитов и нефроцитов крыс, тогда как её однократное введение не оказывает влияния на метаболический статус исследованных клеток.
4. Однократное внутривенное введение суспензии наноразмерного магнетита вызывает обратимые нарушения метаболизма печени, почек и сердца крыс. Изменения при многократном введении суспензии магнетита сохраняются в течение всего эксперимента и носят дозозависимый характер.
5. Наноразмерные частицы магнетита, обладая прооксидантными свойствами, вызывают активацию антиоксидантных систем плазмы крови крыс.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Мильто, И.В. Влияние наноразмерных частиц на морфологию внутренних органов мыши при внутривенном введении раствора нанопорошка Fe_3O_4 / И.В. Мильто, Г.А. Михайлов, А.А. Магаева, А.В. Ратькин // Бюллетень сибирской медицины. - 2008. - № 1. – С. 26-30.
2. Мильто, И.В. Гистологический контроль проникновения наночастиц в кровеносное русло при внутрибрюшинном введении крысам раствора нанопорошка Fe_3O_4 / И.В. Мильто, А.А. Магаева, О.А. Мальцева // Санкт-

Петербургские научные чтения : материалы II Международного молодёжного медицинского конгресса. - СПб, 2007. – С. 100-101.

3. Мильто, И.В. Использование магнитных наночастиц в биомедицине / И.В. Мильто, А.Г. Першина, А.Э. Сазонов // Бюллетень сибирской медицины. - 2008. - № 2. – С. 29-37.

4. Мильто, И.В. Биологические эффекты магнитолипосом на основе наноразмерных частиц магнетита / И.В. Мильто // Материалы X конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск, 2009. – с. 92-93.

5. Мильто, И.В. Биологические эффекты магнитолипосом на основе наноразмерных частиц магнетита / И.В. Мильто // Опто-, наноэлектроника, нанотехнологии и микросистемы : труды международной конференции. – Ульяновск, 2009, - С. 179-181.

6. Мильто, И.В. Биохимические показатели плазмы крови крыс при внутривенном введении нанопорошка магнетита / И.В. Мильто, Е.Ф. Калугина, А.А. Магаева // Гигиена и санитария. – 2008. - № 4. – С. 45-50.

7. Мильто, И.В. Влияние липосомального комплекса наноразмерных частиц магнетита на структуру внутренних органов крыс / И.В. Мильто, И.В. Суходоло // Химическая биология – фундаментальные проблемы бионанотехнологии : сборник трудов научной конференции. – Новосибирск, 2009. – С. 40.

8. Мильто, И.В. Влияние липосомального комплекса наноразмерных частиц магнетита на структуру некоторых внутренних органов крыс / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, А.Н. Дзюман // Морфология. – 2009. – № 4. - С. 98-99.

9. Мильто, И.В. Морфологический контроль состояния внутренних органов крысы при внутрибрюшинном введении нанопорошка Fe_3O_4 / И.В. Мильто, Г.А. Михайлов // Материалы Всероссийской 66-ой итоговой студенческой конференции им. Н.И. Пирогова. - Томск, 2007. – С. 123-125.

10. Мильто, И.В. Морфологическое исследование внутренних органов мыши при многократном внутривенном введении стабилизированного раствора нанопорошка Fe_3O_4 / И.В. Мильто, О.И. Острикова // Вестник РГМУ. - 2008. – №2. - С. 312-313.

11. Мильто, И.В. Морфология внутренних органов крысы при внутривенном введении нанопорошка магнетита / И.В. Мильто, И.В. Мальцева // Материалы Всероссийской 67-ой итоговой студенческой конференции им. Н.И. Пирогова. - Томск, 2008. – С. 384-386.

12. Мильто, И.В. О преимуществе использования параформа, как фиксатора в гистохимической реакции выявления апудоцитов методом Solcia / И.В. Мильто, Г.А. Михайлов // Материалы Всероссийской 65-ой итоговой студенческой конференции им. Н.И. Пирогова.- Томск, 2006. – С. 348-350.

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

14. Мильто, И.В. Физическое нацеливание наночастиц постоянным магнитным полем при внутривенном введении крысам раствора нанопорошка Fe_3O_4 / И.В.

Мильто, О.И. Острикова // Материалы Всероссийской 67-ой итоговой студенческой конференции им. Н.И. Пирогова. - Томск, 2008. – С. 388-390.

15. Получение магнитолипосом на основе наночастиц Fe_3O_4 , как носителя для разработки магнитоуправляемой системы целевой доставки лекарственных препаратов в онкологии / И.В. Мильто и др. // Актуальные проблемы медицины : сборник трудов одиннадцатой межрегиональной научно-практической конференции. - Абакан, 2008. – С. 226.

Список использованных сокращений

γ -ГТ – γ -глутамилтрансфераза

АлАТ – аланинаминотрансфераза

АсАТ – аспартатаминотрансфераза

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АФК – активные формы кислорода

ГБДГ – гидроксibuтиратдегидрогеназа

КФК – креатинфосфокиназа

КФК-МВ – креатинфосфокиназа МВ

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МНФ – моноклеарные фагоциты

МРТ – магнитно-резонансная томография

НАД⁺ – окисленный никотинамидадениндинуклеотид

НАДН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ⁺ – окисленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НАДФН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НЧМ – наноразмерные частицы магнетита

СДГ – сукцинатдегидрогеназа

ЩФ – щелочная фосфатаза

Автор выражает глубокую признательность проректору ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, член.-корр. РАМН, проф. Огородовой Л.М., начальнику лаборатории электронной микроскопии ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, канд. физ.-мат. наук Миллеру А.А., руководителю отделения рентгеновских и томографических методов диагностики, д-ру мед. наук Усову В.Ю., директору ОСП НИИ ББ ТГУ Кривовой Н.А., зав. клинко-диагностической лаборатории медицинского центра №1 клинической больницы №81 ФМБА РФ, врачу КЛД высшей категории Барановой И.А., врачу КЛД высшей категории клинко-диагностической лаборатории медицинского центра №1 клинической больницы №81 ФМБА РФ Масловой О.С., ведущему научному сотруднику Отдела структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН, канд. физ.-мат. наук Итину В.И., старшему научному сотруднику Отдела структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН, канд. хим. наук Магаевой А.А., ученому секретарю Отдела структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН, канд. тех. наук Тереховой О.Г., руководителю сектора гематологии, иммунологии и морфологии ЦНИЛ ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, д-ру мед. наук Шевцовой Н.М., зав. виварием ЦНИЛ ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава Воронцовой В.Н.

Подписано в печать 12.04.2010 г.
Усл. печ. листов 0,65. Печать на ризографе.
Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ
634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел. 53-04-08

Заказ № 75. Тираж 100 экземпляров.