

Морфологические изменения в почках при различных способах введения покрытых и непокрытых наночастиц железа

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии

Введение

Железные наночастицы (НЧ), в частности оксидов железа, обладающие магнитными свойствами, уже широко применяются для биомедицинских целей *in vivo*, например, для усиления контрастирования и повышения диагностической чувствительности в МРТ [6,7], целевой доставки и специфического связывания терапевтических агентов в биоткани [8], гипертермии с помощью переменного магнитного поля, тканевой инженерии [2,10]. На сегодня недостаточно освещены вопросы изучения накопления и морфологических изменений во внутренних органах при различных методах введения НЧ, хотя есть работы, посвященные пероральному, внутримышечному введению нестабилизированных НЧ, показавшие, что данные методы не эффективны для диагностики и последующего лечения опухолей и оказывают умеренно выраженный токсический эффект на внутренние органы [1,3-5,9]. Так как одним из основных органов выведения продуктов обмена, в том числе лекарственных веществ, являются почки, нами было принято решение изучить влияние наночастиц на данный орган.

Цель: изучение морфометрических и морфологических изменений почек лабораторных крыс, в том числе и с перевитым раком печени РС-1, при различных дозировках и путях введения непокрытых НЧ железа и стабилизированных цитратом.

Материал и методы

В экспериментах использовались белые беспородные крысы-самцы весом 180–200 г, интактные и с перевитой опухолью – рак печени РС-1 (опухолевый штамм получен в РОНЦ им.Н.Н. Блохина). Работа с лабораторными животными осуществлялась согласно протоколу исследований в соответствии с Женевской конвенцией 1985 г. и Хельсинкской декларацией 2000 г. о гуманном отношении к животным. Было проведено 5 серий экспериментов.

1 серия – изучение морфологических изменений в почках лабораторных животных при однократном внутримышечном и пероральном введении не покрытых оболочкой наночастиц железа и стабилизированных цитратом наночастиц железа. В каждой группе было по 10 животных, всего было введено 5 групп. В первой группе каждая крыса получала по одной внутримышечной инъекции непокрытых, а во второй – цитрат-стабилизированных наночастиц железа в каждое бедро в дозировке 7,4 мг/кг. В третьей и четвертой группах аналогично животные получали наночастицы железа в дозировке 14,8 мг/кг. Пятая группа была контрольной, в которой животные получали инъекцию 1 мл физиологического раствора.

2 серия – изучение морфологических изменений во внутренних органах при однократном пероральном введении непокрытых и стабилизированных цитратом наночастиц железа в дозировке 4,5 мг/кг. В контрольной группе 10 крыс получали однократно 1 мл физиологического раствора.

Через 24 часа после введения все животные выводились из эксперимента путем декапитации, забирались почки для гистологических исследований.

3 серия – животные были разделены на 3 опытные группы по 10 крыс в каждой, получавших в течение 7 дней перорально раствор наночастиц железа (Fe_3O_4 , 20 нм ± 10), Zp = -30 mv, покрытых цитратной оболочкой, в дозировке 250 мкг/кг, 500 мкг/кг и 1000 мкг/кг. Группа сравнения (10 особей) получала в течение 7 дней перорально 1 мл физиологического раствора, затем на 8 сутки крысам с перевитой опухолью рака печени РС-1 проводилось исследование методом магнитно-резонансной томографии, затем все животные выводились из эксперимента путем декапитации, забирались внутренние органы и опухоль для гистологических исследований.

4 серия – изучение морфологических изменений во внутренних органах и перевитой опухоли в 4-х группах лабораторных животных при однократном и многократном внутрибрюшинном введении наночастиц железа, покрытых цитратной оболочкой, – по 10 крыс с перевиваемой опухолью рака печени РС-1в каждой.

1-я группа: вводили раствор наночастиц железа (Fe_3O_4 , 20 нм ± 10), Zp = -30 mv, покрытых цитратной оболочкой, в дозировке 1000 мкг/кг однократно внутрибрюшинно;

2-я группа: в течение 7 дней внутрибрюшинно в дозировке 250 мкг/кг. Две группы сравнения, каждая состоящая из 10 белых беспородных крыс с перевитым раком печени РС-1, получали внутрибрюшинно инъекцию 1мл физиологического раствора либо однократно, либо в течение 7 дней. Затем животные, получавшие однократное введение, выводились из эксперимента через 1 сутки. Животным с многократным введением на 8-е сутки проводилось исследование методом магнитно-резонансной томографии, и животные выводились из эксперимента путем декапитации, забирались внутренние органы и опухоль для гистологических исследований.

5 серия – изучение морфологических изменений во внутренних органах и перевитой опухоли лабораторных животных при однократном внутривенном введении наночастиц железа, покрытых цитратной оболочкой. В 5-й серии эксперимента 2 группы крыс с перевиваемой опухолью рака печени РС-1 получили однократно внутривенно раствор наночастиц железа (Fe_3O_4 , 20 нм ± 10), Zp = -30 mv, покрытых цитратной оболочкой: 1-я группа – в дозировке 0,2 мг/кг; 2-я – в дозировке 16 мг/кг. Третья группа (сравнения) получила однократно внутривенно 1мл физиологического раствора. В каждой группе было по 10 крыс. На 2-е сутки крысам проводилось исследование методом магнитно-резонансной томографии, и животные выводились из эксперимента путем декапитации, забирались внутренние органы и опухоль для гистологических исследований.

Для оценки качественных изменений в органах (выраженность полнокровия, отека, дистрофии, феномена сепарации крови и эмфиземы легких) применялась полуколичественная оценка в баллах, в зависимости от выраженности признака, от 0 до 3-х баллов: 0 – отсутствие признака, 1 балл – слабо выраженный признак, 2 балла – умеренно выраженный признак, 3 балла – выраженный признак. В почках измеряли высоту эпителия извитых канальцев, периметр и площадь клубочков.

Все морфометрические исследования и фотографирование проводились в 10 полях зрения при увеличении 774 с помощью Микровизора медицинского проходящего света μ Vizo-101 (ЛОМО).

Для обработки полученных в ходе исследований данных был использован пакет прикладных статистических программ «SPSS 17.0». Представленная статистическая обработка данных заключалась в проверке соответствия формы распределения количественных признаков нормальному с помощью применения теста Колмогорова-Смирнова. Нулевую гипотезу отвергали в случае $p < 0,05$. Для каждого показателя в исследуемых группах вычисляли среднее арифметическое (M), среднюю ошибку среднего арифметического (m), среднеквадратичное отклонение (σ). Показатель достоверности различий (P) определялся с использованием критериев Стьюдента (t). Различия оценивались как достоверные при вероятности 95% ($P < 0,05$) и выше.

Результаты

При внутримышечном введении непокрытых наночастиц отмечали увеличение полнокровия сосудов коркового вещества. При внутримышечном введении покрытых цитратом наночастиц, так же, как и непокрытых, отмечали увеличение полнокровия сосудов коркового вещества, появление зернистой дистрофии эпителиоцитов извитых канальцев, а также некоторое уменьшение просвета между капсулой Шумлянского-Боумена и сосудистыми петлями клубочка.

При анализе морфометрических показателей в почках установлено, что однократное внутримышечное введение непокрытых наночастиц железа как в дозировке 7,4 мг/кг, так и в дозировке 14,8 мг/кг не приводит к статистически значимому увеличению размеров клубочков по площади и по периметру. Однако статистически значимо увеличивалась высота эпителиоцитов извитых канальцев: в 2 и 2,7 раза при соответствующих дозировках 7,4 мг/кг и 14,8 мг/кг за счет развития дистрофических изменений. Однократное внутримышечное введение покрытых цитратом наночастиц железа приводит к незначительному уменьшению размеров клубочков и статистически значимому увеличению средней высоты эпителиоцитов извитых канальцев, которое зависит от вводимой дозировки (табл.1).

При однократном пероральном введении наночастиц железа отмечали увеличение полнокровия сосудов коркового и мозгового вещества по сравнению с контролем и развитие зернистой дистрофии эпителиоцитов извитых канальцев. В почках при однократном пероральном введении наночастиц железа отмечали увеличение полнокровия сосудов коркового и мозгового вещества по сравнению с контролем.

При анализе морфометрических показателей в почках было установлено, что однократное пероральное введение непокрытых наночастиц железа в дозировке 4,5 мг/кг приводит к статистически значимому увеличению размеров клубочков, а также увеличению средней высоты эпителиоцитов извитых канальцев по сравнению с контролем. Однократное пероральное введение покрытых цитратом наночастиц железа в дозировке 4,5 мг/кг приводит только к статистически значимому увеличению в 2 раз средней высоты эпителиоцитов извитых канальцев за счет развития дистрофических изменений (табл. 1).

При многократном пероральном введении покрытых наночастиц железа корковое и мозговое вещество имели нормальное строение, клеточной инфильтрации не выявлено, уротелий не был изменен. Обращало на себя внимание полнокровие сосудов мозгового вещества и клубочков при дозировках 500 и 1000 мкг/кг; развивалась зернистая дистрофия эпителиоцитов извитых и прямых канальцев по мере увеличения дозировки, а также увеличивался просвет между клубочком и капсулой Шумлянского-Боумена по сравнению с группой сравнения.

При анализе морфометрических показателей в почках мы установили, что длительное введение наночастиц железа в дозировке 250 мкг/кг не приводило к статистически значимым изменениям размеров клубочков и эпителиоцитов извитых канальцев. При длительном введении наночастиц железа в дозировках 500 и 1000 мкг/кг наблюдали уменьшение размеров клубочков по площади и увеличение высоты эпителиоцитов в среднем в 1,6 раза (табл. 1).

При однократном внутрибрюшинном введении наночастиц наблюдали полнокровие сосудов коркового и мозгового вещества и интерстициальной зоны, феномен сепарации крови в крупных сосудах, зернистую дистрофию извитых и прямых канальцев, расширенные собирательные трубочки. Просвет капсулы Шумлянского-Боумена был свободен, кровенаполнение клубочков снижено по сравнению с контролем. Уротелий почечной лоханки в норме. **При многократном внутрибрюшинном введении** наночастиц в почках обнаружили полнокровие сосудов мозгового вещества, единичные периваскулярные кровоизлияния, набухание и зернистую дистрофию эпителия извитых и прямых канальцев. Просвет капсулы Шумлянского-Боумена был также свободен, отмечали малокровие клубочков по сравнению с контролем. Уротелий почечной лоханки был не изменен.

При анализе морфометрических показателей при однократном внутрибрюшинном введении отмечали статистически значимое снижение размеров клубочков по площади на 15,5%, по периметру на 11% и увеличение средней высоты эпителиоцитов извитых канальцев на 16% по сравнению с контрольной группой; при многократном внутрибрюшинном введении наночастиц статистически значимое увеличение размеров клубочков – только по периметру на 5%, статистически значимого изменения средней высоты эпителиоцитов извитых канальцев по сравнению с контрольной группой не наблюдали (табл. 1).

При внутривенном введении цитрат-стабилизированных наночастиц железа мы отмечали, что структура коркового и мозгового вещества имела обычное строение, клеточной инфильтрации не выявлялось, уротелий не изменен, развивался феномен сепарации крови в крупных сосудах. К статистически значимым морфологическим изменениям, выявленным в почке, относились: увеличение полнокровия сосудов мозгового вещества и клубочков, выраженная зернистая дистрофия эпителия извитых канальцев, уменьшение просвета между клубочком и капсулой Шумлянского-Боумена по сравнению с контролем. Встречались единичные некротизированные эпителиоциты извитых канальцев.

При анализе морфометрических данных структурных элементов почки после введения покрытых наночастиц железа в дозировке 20 мкг/кг было установлено статистически значимое по сравнению с группой сравнения уменьшение размеров клубочков, а также увеличение высоты эпителиоцитов извитых канальцев из-за развития в них выраженной дистрофии. При дозировке 16 мг/кг в почках развивались такие же процессы, как и при предыдущей дозировке (рис.1, табл. 1).

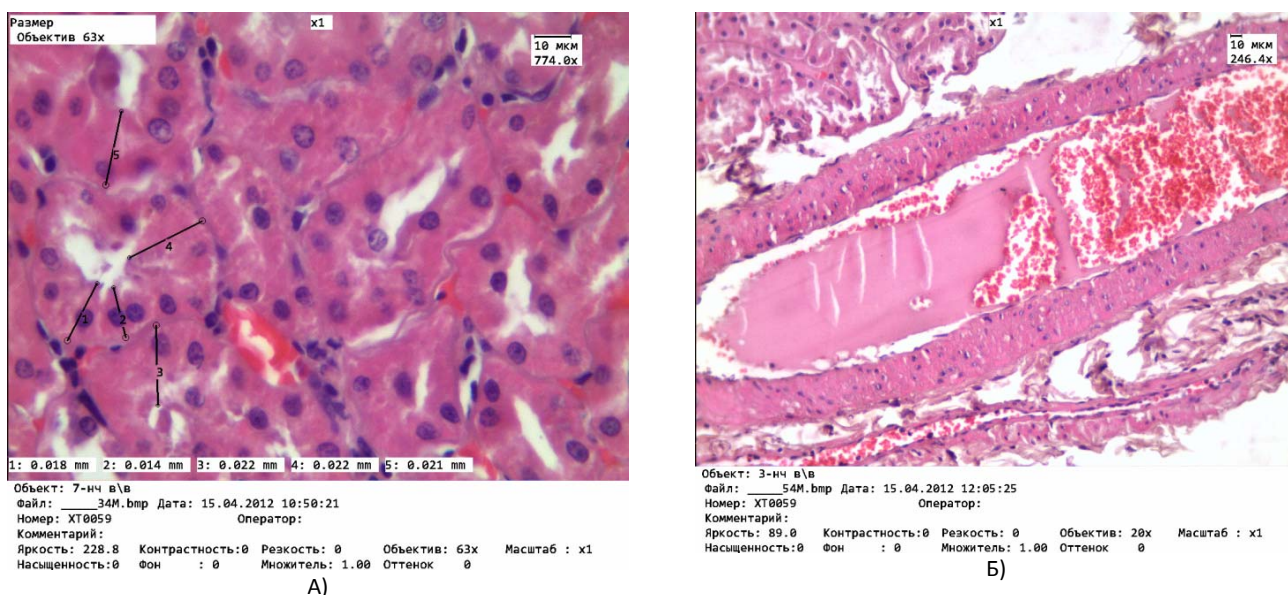


Рис.1. А) Увеличение высоты эпителиоцитов извитых канальцев после однократного внутривенного введения наночастиц железа в дозировке 20 мкг/кг. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 774; Б) Феномен сепарации крови в сосуде крупного калибра после однократного внутривенного введения наночастиц железа в дозировке 16 мкг/кг. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4.

Таблица 1. Морфометрические изменения в почках при разных способах введения наночастиц железа

Группа	Дозировка	S клубочков (мм ²)	P клубочков (мм)	Высота эпителиоцитов (мм)
Контроль	-	0,017±0,0042	0,52±0,0066	0,0055±0,0002
В/мышечное введение Непокрытые НЧ железа	7,4 мг/кг	0,016±0,004	0,54±0,05	0,011±0,0006***
	14,8 мг/кг	0,018±0,003	0,65±0,041	0,015±0,0007***
В/мышечное введение Покрытые НЧ железа	7,4 мг/кг	0,0026±0,0008**	0,195 ±0,04***	0,01±0,0004**
	14,8 мг/кг	0,0032±0,00021	0,222±0,0064	0,015±0,0007***
Пероральное однократное введение: Непокрытые НЧ железа	4,5 мг/кг	0,27±0,08***	1,88±0,377***	0,04±0,004***
Пероральное однократное введение: Покрытые НЧ железа	4,5 мг/кг	0,0031±0,0001	0,21±0,006	0,019±0,001***
Группа сравнения пероральное введение		0,0039±0,00018	0,232±0,0054	0,012±0,0003
Многократное пероральное введение Покрытые НЧ	250 мкг/кг	0,0031±0,0001	0,209±0,0055	0,0099±0,0002
	500 мкг/кг	0,0025±0,00015*	0,18±0,0049*	0,018±0,0003*
	1000 мкг/кг	0,0021±0,00006*	0,18±0,002*	0,015±0,00034*
Группа сравнения внутривенное введение		0,0039±0,00018	0,232±0,0054	0,012±0,0003
Однократное внутривенное введение: Покрытые НЧ Fe		0,0033±0,0002***	0,208±0,009**	0,014±0,0002*
Многократное внутривенное введение: Покрытые НЧ Fe		0,0034±0,0001	0,22±0,00507**	0,011±0,0002
Группа сравнения		0,0096±0,00038	0,3673±0,00634	0,0099±0,00025
Однократное в/венное введение: Покрытые НЧ Fe	20 мкг/кг	0,0063±0,00016***	0,302±0,00388***	0,0179±0,00031***
Многократное в/венное введение: Покрытые НЧ Fe	16 мкг/кг	0,0073±0,0005***	0,3±0,011***	0,017±0,00049***

Примечание: * — различия значимы при сравнении значений опытной и контрольной групп или группы сравнения при P<0,05;** — различия значимы при сравнении значений опытной и контрольной групп или группы сравнения при P<0,005;*** — различия значимы при сравнении значений опытной или группы сравнения при P<0,001

Обсуждение

При однократном введении в почках непокрытые частицы вызывают увеличение площади клубочков и в меньшей степени – высоты эпителиоцитов извитых канальцев, в то время как покрытые наночастицы несколько уменьшают площадь клубочков и увеличивают высоту эпителиоцитов извитых канальцев. Возможно, это обусловлено тем, что непокрытые частицы образуют более крупные агрегаты, чем отдельно воздействующие стабилизированные частицы, и поэтому их взаимодействие с клетками меняется.

При многократном пероральном введении покрытых цитратом наночастиц изменения носили дозозависимый характер. С увеличением дозировки нарастала степень полнокровия сосудов коркового, мозгового вещества почек и клубочков, дистрофия эпителиоцитов извитых и прямых канальцев. Введение наночастиц в дозировке 250 мкг/кг не влияло на размеры клубочков и высоту эпителиоцитов извитых канальцев, в то время как дозировка в 500 мкг/кг приводила к увеличению высоты эпителиоцитов извитых канальцев.

При внутрибрюшинном введении обращало на себя внимание то, что выраженность изменений в большей степени зависело от дозировки и в меньшей – от длительности введения.

При внутривенном введении дистрофические изменения в эпителии извитых канальцев могли возникать, в первую очередь, за счет токсического влияния опухоли. Развитие коллапса клубочков, что было подтверждено морфометрически, возможно, связано с циркуляцией в кровотоке наночастиц. И.В. Мильто, Г.А. Михайлов, А.В. Ратькин и соавт. (1980), изучавшие морфологию почек крыс при внутривенном введении наночастиц Fe_3O_4 , отмечали также полнокровие сосудов мозгового вещества и расширение капсулы Шумлянско-Боумана, которого в нашем эксперименте мы не наблюдали, что может быть обусловлено другим размером и покрытием наночастиц.

Выводы

Непокрытые частицы за счет образования конгломератов больше влияют на изменения размеров клубочков, приводя к их увеличению за счет полнокровия, в то время как цитрат-стабилизированные частицы вызывают дистрофию извитых канальцев с увеличением высоты эпителиоцитов, что, возможно, приводит к сдавлению клубочков. Таким образом, морфологические изменения в почках при введении наночастиц железа в большей степени зависят от дозировки и наличия покрытия, чем от длительности их введения, так как наличие цитратной оболочки способствует их стабилизации в кровотоке и тканях и большей биосовместимости, что и определяет их меньшую токсичность.

Литература

1. Динамика морфологических и биохимических изменений у лабораторных животных с перевитым раком почки при внутривенном введении золотых наноболочек / Н. А. Наволокин, Г. Н. Маслякова, А. Б. Бучарская, Л. В. Сулейманова, С. М. Кун, Г. С. Терентюк, Н. Г. Хлебцов, Б. Н. Хлебцов // Известия Саратовского государственного университета. Сер. Физика. 2012. Т. 12, № 2. С. 37-43.
2. Синтез гидрозолей магнетита и их воздействие на живые системы на клеточном и тканевом уровнях / С. В. Герман, О. А. Иноземцева, Н. А. Наволокин, А. В. Маркин, Е. Е. Пудовкина, П. О. Петров, Е. С. Тучина, А. Б. Бучарская, С. Н. Плескова, Г. К. Маслякова, Д. А. Горин // Российские нанотехнологии. 2013. № 7-8. С. 118-123.
3. Морфологические изменения во внутренних органах лабораторных животных при однократном введении наночастиц Fe / Н. А. Наволокин, О. В. Матвеева, Г. Н. Маслякова, А. Б. Бучарская, Л. В. Сулейманова, С. М. Кун, Б. А. Медведев, А. А. Игнатъев, Т. В. Бочкарёва // Известия Саратовского государственного университета. Сер. Физика. 2011. Т. 11, № 2. С. 62-66.
4. Наволокин Н. А., Кун С. М. Морфологические изменения внутренних органов и головного мозга при пролонгированном пероральном введении наночастиц железа // Саратовский научно-медицинский журнал. 2011. Т. 7, № 4. С. 760-762.
5. Применение морфологических методов исследования в наноонкологии / Г. Н. Маслякова, А. Б. Бучарская, Н. А. Наволокин, А. А. Широков, А. М. Буров // Вестник биотерапевтического журнала. 2011. № 4. С. 104.
6. Chouly C., Pouliquen D., Lucet I., Jeune J. J., Jallet P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution // J. Microencapsulation. 1996. Vol. 13. P. 245.
7. Gupta A. K, Curtis A. S. G. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors // Biomaterials. 2004. Vol. 25. P. 3029.
8. Jun Y., Lee J.-H., Cheon J. Chemical Design of Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance Imaging // Angewandte Chemie International Edition. 2008. Vol. 47. P. 5122.
9. Navolokin N. A., Maslyakova G. N., Bucharskaya A. B., Kong X. M. Morphological changes in the kidney, liver and spleen during prolonged administration of iron nanoparticles // Journal of Physics: Conference Series. 2012. Vol. 345. № 012043. doi:10.1088/1742-6596/345/1/012043.
10. Reimer P., Weissleder R. Development and experimental application of receptor-specific MR contrast media // Radiologie. 1996. Vol. 36. P. 153.