

ID: 2016-02-1276-A-6080

Оригинальная статья

Бучарская А.Б., Дихт Н.И., Афанасьева Г.А., Терентюк Г.С., Маслякова Г.Н., Наволокин Н.А., Пахомий С.С., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г.

Морфологические изменения в почках и показатели перекисного окисления липидов сыворотки крови у крыс с перевитым раком печени и аллоксановым диабетом при внутривенном введении золотых наностержней

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

Резюме

Для оценки воздействия однократного внутривенного введения золотых наностержней с различным покрытием - полиэтиленгликолевым и полистиролсульфонатным на показатели перекисного окисления в сыворотке крови и морфологические изменения в почках у крыс с аллоксановым диабетом и перевитым раком РС-1 проведено экспериментальное исследование на 36 беспородных белых крысах. Внутривенное введение золотых наностержней с различными видами покрытий не вызывало значительных морфологических изменений у крыс с моделированными аллоксановым диабетом и перевитым раком печени. Отмечено накопление продуктов липопероксидации при внутривенном введении золотых наностержней, покрытых полистиролсульфонатом, что может быть обусловлено наличием отрицательного заряда у наночастиц с данным полимерным покрытием, в связи с чем рекомендовано использование покрытых полиэтиленгликолем золотых наностержней в исследованиях на животных с моделированными патологическими процессами.

Ключевые слова: золотые наностержни, почка, сыворотка крови, рак печени, аллоксановый диабет

Введение

В настоящее время актуальной проблемой медицины является создание и разработка новых терапевтических технологий на основе использования наночастиц для лечения социально значимых заболеваний.

В Российской Федерации ежегодно выявляют около полумиллиона больных со злокачественными новообразованиями. Смертность населения от онкологических заболеваний постоянно растет и занимает второе место в общей структуре смертности после сердечно-сосудистых заболеваний, так в 2013 году она составила 15.3% населения РФ.

Одной из серьезных проблем современного общества является стремительный рост заболеваемости сахарным диабетом. Неутешительные прогнозы экспертов Международной диабетической федерации свидетельствуют о том, что к 2030 году количество больных сахарным диабетом может достигнуть 552 миллиона человек, то есть 9,9% населения планеты [1].

Имеющиеся на сегодняшний день методы лечения онкологических заболеваний и сахарного диабета пока оказывают мало эффективными, а задача поиска новых терапевтических средств продолжает оставаться наиболее актуальной в онкологии и диабетологии. Одним из таких научных направлений поиска является применение нанотехнологий в лечении онкологических заболеваний и сахарного диабета. Для биомедицинского применения одними из наиболее перспективных считаются золотые наночастицы, это обусловлено замечательными электрохимическими и оптическими свойствами коллоидного золота, в частности, биосовместимостью, устойчивостью к окислению и способностью к плазмонному резонансу [2].

Немаловажную роль для биомедицинского применения является низкая токсичность золотых наночастиц, установленная многочисленными исследованиями *in vitro* и *in vivo* [3-5].

В настоящее время различными исследовательскими группами для плазмонно-резонансной гипертермии в онкологии предложено использование различных золотых наночастиц: наноболочек, наностержней, наноклеток, нанокубов и других [6-9].

Известны данные о терапевтическом воздействии золотых наночастиц при сахарном диабете. Установлено, что вследствие гипергликемии и эндогенной интоксикации при данном заболевании наблюдается значительное повышение уровня свободных радикалов, концентрация которых может быть снижена при использовании золотых наночастиц [10].

Исследования, проведенные на клеточном уровне, показали, что характер взаимодействия наночастиц с клетками во многом определяется типом покрытия наночастиц [11]. Для улучшения биосовместимости наночастиц, повышения их стабильности и простоты функционализации в настоящее время используются различные биосовместимые полимеры [12].

Важным условием применения новых материалов в медицине является подробное изучение их влияния на организм, в особенности, на фоне имеющихся патологических процессов.

Цель исследования: оценить влияние однократного внутривенного введения золотых наностержней с различным покрытием (полиэтиленгликоль и полистиролсульфонат) на показатели перекисного окисления в сыворотке крови и морфологические изменения в почках у крыс с аллоксановым диабетом и перевитым раком РС-1.

Материал и методы

В экспериментах использовали золотые наностержни (ЗНС) со средними размерами длины и диаметра стержней равными нм и нм соответственно, с концентрацией золота 400 мкг/мл, покрытые полиэтиленгликолем (PEG) и полистиролсульфонатом (PSS), синтезированные в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН (г. Саратов). Геометрические параметры наностержней определяли по трансмиссионным электронно-микроскопическим (ТЭМ) изображениям, полученным на электронном микроскопе Libra-120 (CarlZeiss, Germany) в Центре коллективного пользования ИБФРМ РАН.

Экспериментальное исследование было выполнено на базе Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической нефрологии СГМУ им.В.И.Разумовского на 36 белых беспородных половозрелых крысах-самцах с массой тела 200±20 г. Эксперименты на животных выполняли в соответствии с руководством [13]. Животные находились в одинаковых условиях, получали стандартный рацион питания один раз в день, при свободном доступе к воде. Животные были разделены на 3 группы, в каждой группе по 12 крыс. Первая группа – контрольная, здоровые животные, в этой группе 4 животных оставались интактными, 4 животным вводили внутривенно по 1 мл раствора ЗНС с PEG-покрытием, 4 животным вводили внутривенно по 1 мл

раствора ЗНС с PSS-покрытием. Животным второй группы имплантировали подкожно, в области лопатки, по 0,5 мл 25% опухолевой взвеси в растворе Хэнкса штамма альвеолярного рака печени PC-1, полученного из банка опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина имплантировали подкожно, в области лопатки, по 0,5 мл 25% опухолевой взвеси в растворе Хэнкса штамма альвеолярного рака печени PC-1, полученного из банка опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина. При достижении размеров опухоли $3 \pm 0,3 \text{ см}^3$ 4 животных оставались интактными, 4 животным вводили внутривенно по 1 мл раствора ЗНС с PEG-покрытием, 4 животным вводили внутривенно по 1 мл раствора ЗНС с PSS-покрытием. Животным третьей группы для моделирования аллоксанового диабета внутрибрюшинно вводили аллоксан моногидрат («Sigma», США) в дозе 100 мг/кг. На 15 сутки после введения аллоксана проводилось определение глюкозы крови. Для определения уровня глюкозы в крови использовали глюкометр Accu-Chek Performa Roche (Швейцария). После этого 4 животных оставались интактными, 4 животным вводили внутривенно по 1 мл раствора ЗНС с PEG-покрытием, 4 животным вводили внутривенно по 1 мл раствора ЗНС с PSS-покрытием. Все животные выводились из эксперимента путем декапитации через сутки после внутривенного введения золотых наностержней.

При выведении из эксперимента у крыс проводили забор сыворотки крови для исследования активности процессов перекисного окисления липидов по содержанию промежуточных продуктов липопероксидации – малонового диальдегида (МДА), гидроперекисей липидов (ГПЛ) и маркера аутоинтоксикации – молекул средней массы (МСМ) с использованием общепринятых спектрофотометрических методов на спектрофлуориметре RF-5301 PC (Shimadzu Corporation, Япония).

Для морфологического исследования почки фиксировали в 10%-м растворе формалина, подвергали стандартной спиртовой и ацетоновой проводке, заливали в парафин. После депарафинизации срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином для обзорного гистологического изучения.

Морфометрический анализ гистологических препаратов проводили с использованием системы анализа цифровых изображений Микровизора медицинского μ Vizo-101 ЛОМО. Для обработки полученных в ходе исследований данных был использован пакет прикладных статистических программ SPSS - 13.0. Проверку нормальности распределения значений в выборке проводили с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения, $M \pm SD$. Для сравнения средних был использован критерий Крамера-Уэлча (T), при котором разность средних арифметических двух выборок (контрольной и экспериментальной) делится на естественную оценку среднего квадратического отклонения этой разности. При данном методе отличия средних определяется при $T \geq 1,96$ с вероятностью в 95%.

Результаты

При морфологическом исследовании почек крыс при однократном внутривенном введении ЗНС, покрытых полиэтиленгликолем полистиролсульфонатом, значительных морфологических изменений не было обнаружено. При морфометрическом исследовании (Табл.1) отмечалось небольшое уменьшение площади клубочков в подгруппе с введением PSS ЗНС - $4,9 \pm 0,4 \text{ мкм}^2$ (при контрольных показателях $6,8 \pm 0,3 \text{ мкм}^2$). В обеих опытных подгруппах канальцы имели округлую форму, просвет их был свободный, в подгруппе с введением PSS ЗНС - просвет канальцев был сужен за счет увеличения высоты эпителия - $25,6 \pm 0,4 \text{ мкм}$ (в контроле - $15,3 \pm 1,3 \text{ мкм}$). Базальные мембраны канальцев не изменены. Строма коркового слоя была представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью, отмечалось умеренное полнокровие коркового слоя.

По результатам биохимических исследований накопление продуктов перекисного окисления липидов было отмечено в контрольной группе животных при внутривенном введении ЗНС, покрытых PSS (Табл. 2).

В группе лабораторных животных после введения аллоксана отмечались клинические признаки диабета – полидипсия, полиурия, на 5-е сутки шерсть животных стала влажной с грязно-коричневым оттенком. В сыворотке крови животных наблюдалось достоверное повышение уровня глюкозы до $18,5 \pm 3,2 \text{ ммоль/л}$ ($p < 0,05$) на 15 сутки после введения аллоксана, что почти в 3 раза превышало значения данного показателя в контрольной группе животных ($6,2 \pm 1,2 \text{ ммоль/л}$).

При исследовании почек лабораторных животных второй группы были обнаружены изменения, характерные для аллоксанового диабета. Следует отметить, что у животных данной группы отмечалось увеличение клубочков и расширение капсулы Шумлянского-Боумана за счет отека, что подтверждается результатами морфометрического исследования – площадь клубочка значительно увеличилась и составила $9,3 \pm 0,4 \text{ мм}^2$ (при контрольных значениях – $6,8 \pm 0,3 \text{ мм}^2$), высота эпителия извитых канальцев в группе животных с диабетом была увеличена и составляла $19,5 \pm 0,8 \text{ мкм}$ (в контроле - $15,3 \pm 1,3 \text{ мкм}$). При исследовании групп животных с моделированным аллоксановым диабетом и однократным внутривенным введением ЗНС, покрытых PEG и PSS, в почках значительных различий между подгруппами не обнаружено. В корковом веществе морфологические изменения были представлены преимущественно умеренным полнокровием, дистрофическими изменениями эпителия извитых канальцев от незначительной до умеренной степени выраженности. В клубочковом аппарате почек отмечалось неравномерно выраженное полнокровие, в некоторых случаях – утолщение капсулы Шумлянского-Боумана, в мелких артериолах - плазматическое пропитывание. Следует отметить, что в группе введения PSS в 50% случаев наблюдений отмечались очаговые лимфоидные инфильтраты среди клубочков. Уротелий чашечно-лоханочной системы находился в состоянии атрофии. Результаты морфометрического исследования показали, что площади клубочков в подгруппах с введением ЗНС, покрытых PEG и PSS, статистически не отличались от показателей в контрольной группе. В обеих опытных подгруппах канальцы имели округлую форму, просвет их был свободный, по высоте эпителия они достоверно не отличались от канальцев у животных с аллоксановым диабетом.

Таблица 1. Морфометрические показатели почек при внутривенном введении ЗНС

Показатели	Площадь клубочков, мкм^2			Высота эпителия извитых канальцев, мкм			
	Группы животных	Интактные	PEG	PSS	Интактные	PEG	PSS
Контрольная		$6,8 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,4$	$4,9 \pm 0,4^*$	$15,3 \pm 1,3$	$17,2 \pm 1,4$	$25,6 \pm 0,4^*$
Аллоксановый диабет		$9,3 \pm 0,4^*$	$6,6 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,4$	$19,5 \pm 0,8^*$	$18 \pm 0,4^*$	$20,2 \pm 0,9^*$
Рак печени		$5,8 \pm 0,3$	$5 \pm 0,4$	$5,1 \pm 0,6$	$20,5 \pm 0,8^*$	$16,9 \pm 0,7$	$21,3 \pm 0,9^*$

Примечание: * - достоверные отличия по сравнению с показателями контрольной группы животных

Таблица 2. Содержание МДА, ГПЛ и МСМ в сыворотке крови лабораторных животных

Показатели	Малоновый диальдегид (пмоль /мл)			Гидроперекиси липидов (Ед/мл)			Молекулы средней массы (МСМ), (Ед/мл)		
	Интактные	PEG	PSS	Интактные	PEG	PSS	Интактные	PEG	PSS
Контрольная	0,51±0,2	0,53±0,2	1,6±0,2*	0,9 ±0,09	1,2 ±0,15	1,36±0,16*	0,16 ± 0,01	0,27 ±0,01	0,3±0,03*
Диабет	0,84 ±0,1*	0,78±0,08*	2,1±0,3*	3,87±0,08*	3,503±0,04*	3,96±0,4	0,32±0,03*	0,34 ±0,04*	0,3±0,02*
Рак печени	0,93± 0,1*	1,28± 0,18*	2,5±0,3*	2,5 ±0,3*	2,94± 0,4*	3,87±0,3*	0,27±0,05	0,24±0,04	0,37±0,04*

Примечание: * - достоверные отличия по сравнению с показателями контрольной группы животных

При аллоксановом диабете в сыворотке крови крыс отмечали значительное увеличение количества малонового диальдегида ($p<0,05$) и гидроперекисей липидов ($p<0,05$) по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы (табл.2). При внутривенном введении ЗНС, покрытых PEG, не выявляется достоверных отличий с группой животных с аллоксановым диабетом. При внутривенном введении ЗНС, покрытых PSS, выявляется более выраженное накопление малонового диальдегида ($p<0,05$), количество гидроперекисей не изменяется значительно по сравнению с группой животных с аллоксановым диабетом.

В группе животных с перевитым раком печени, а также при однократном внутривенном введении ЗНС, покрытых PEG и PSS, значительных различий с контрольной группой не было обнаружено. В корковом веществе морфологические изменения были представлены преимущественно умеренным полнокровием, дистрофическими изменениями эпителия извитых канальцев от незначительной до умеренной степени выраженности. В клубочковом аппарате почек отмечалось неравномерно выраженное полнокровие, в отдельных случаях – утолщение капсулы Шумлянско-Боумана, в мелких артериолах - плазматическое пропитывание. Уротелий чашечно-лоханочной системы находился в состоянии атрофии. Результаты морфометрического исследования показали, что площадь клубочков при введении PEG- и PSS-покрытых ЗНС, статистически не отличалась от показателей в группе животных с раком печени без воздействия и в контрольной группе. Канальцы имели округлую форму, просвет их был свободный, высота эпителия извитых канальцев была увеличена в группе животных с перевитым раком печени и в подгруппе с введением PSS-покрытых ЗНС по сравнению с контрольной группой.

При перевитом раке печени отмечается накопление продуктов перекисного окисления - МДА и ГПЛ по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$). Однократное внутривенное введение ЗНС, покрытых PEG не вызывает значимых изменений в содержании продуктов липопероксидации, в сыворотке крови животных с перевитым раком печени с внутривенным введением ЗНС, покрытых PSS, было выявлено дальнейшее увеличение содержания МДА и ГПЛ по сравнению с контролем ($p<0,05$). Уровень молекул средней массы – интегративного показателя аутоинтоксикации после внутривенного введения ЗНС, покрытых PSS, также превышал показатели контрольной группы животных ($p<0,05$).

Заключение

Внутривенное введение золотых наностержней с различными видами покрытий не вызывало значительных морфологических изменений у крыс с моделированными аллоксановым диабетом и перевитым раком печени, отмечалось только небольшое увеличение площади клубочков за счет отека. Однако, при исследовании активности перекисного окисления липидов было выявлено более выраженное накопление продуктов липопероксидации при внутривенном введении золотых наностержней, покрытых полистиролсульфатом, чем при использовании полиэтиленгликолевой оболочки. Данные результаты, вероятно, связаны с наличием отрицательного заряда у полистиролсульфатной оболочки наночастиц. Отсутствие значительных морфологических изменений в почках в группах с введением PSS-покрытых золотых наностержней, вероятно, связано с небольшим периодом наблюдения. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование PEG-покрытых золотых наностержней в исследованиях на животных с моделированными патологическими процессами.

Литература

1. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. 5th ed. Brussels, Belgium, International Diabetes Federation, 2011.
2. Glomm W.R. Functionalized gold nanoparticles for application in biotechnology // J. Dispers. Sci. Technol. 2005. 26. 389-414.
3. Khlebtsov, N. G.; Dykman, L. A. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies // Chem. Soc. Rev. 2011. 40. 1647-1671.
4. Terentyuk G.S., Maslyakova G.N., Suleymanova L.V., Khlebtsov B.N., Kogan B.Y., Akchurin G., Shantrocha A.V., Maksimova I.L., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V. Circulation and distribution of gold nanoparticles and induced alterations of tissue morphology at intravenous particle delivery // Biophotonics 2009. 2(5), 292-302.
5. Alkilany A.M., Murphy C.J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far // Journal of Nanoparticle Research 2010. 12, 2313.
6. Xia Y, Li W, Cobley CM, Chen J, Xia X, Zhang Q, et al. Gold nanocages: from synthesis to theranostic applications. Acc Chem Res. 2011; 44: 914–924.
7. Zhang J. Biomedical applications of shape-controlled plasmonic nanostructures: a case study of hollow gold nanospheres for photothermal ablation therapy of cancer. J Phys Chem Lett., 2010; 1:686–695.
8. Huang X., El-Sayed I.H., Qian W., El-Sayed M.A. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. J Am Chem Soc. 2006; 128:2115–20.
9. Khlebtsov N., Bogatyrev V., Dykman L., Khlebtsov B., Staroverov S., Shirokov A., Matora L., Khanadeev V., Pylaev T., Tsyganova N., Terentyuk G. Analytical and theranostic applications of gold nanoparticles and multifunctional nanocomposites// Theranostics. 2013. 3. 167-180.
10. Barath Mani Kanth S., Kalishwaralal K., Sriram M., Ram Kumar Pandian S. Antioxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice//J. Nanobiotechnology. 2010. 8:16.
11. Soenen S.J., Parak W.J., Rejman J., Manshian B. (Intra)Cellular Stability of Inorganic Nanoparticles: Effects on Cytotoxicity, Particle Functionality, and Biomedical Applications//Chem. Rev., 2015, 115 (5), 2109–2135.
12. Hirn S., Semmler-Behnke M., Schleh C., Wenk A., Lipka J., Schäffler M., Takenaka S., Möller W., Schmid G., Simon U., Kreyling W.G. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration //European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011. 77, 407.

13. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals], CIOMS&ICLAS, 2012. <http://www.cioms.ch/index.php/12-newsflash/227-cioms-and-iclas-release-t...>