

ID: 2017-02-1276-A-13116

Оригинальная статья

Наволокин Н.А., Годяге О.С., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Зуев В.В., Герман С.В., Терентюк Г.С., Горин Д.А.

Морфологические изменения во внутренних органах и перевитых опухолях крыс при внутривенном введении наночастиц магнетита

ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

Резюме

В работе представлены результаты морфологического исследования тканей внутренних органов и перевитой опухоли печени у крыс через сутки после внутривенного введения наночастиц магнетита для оценки возможности их использования в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ). При внутривенном введении цитрат-стабилизированных наночастиц железа методами МРТ и атомно-адсорбционной спектрофотометрии (ААС) было установлено накопление железа в опухоли только при внутривенном введении наночастиц магнетита в дозировке 16 мг/кг. Морфологические изменения в виде полнокровия и обратимой дистрофии, развивающиеся в печени и почках при введении данной дозировки, имеют обратимый характер. Установлено иммуностимулирующее действие наночастиц магнетита на белую пульпу селезенки и перибронхиальные лимфоидные фолликулы. Полученные результаты свидетельствуют, что предложенная стратегия внутривенного введения цитрат-стабилизированных наночастиц магнетита является эффективной и перспективной для использования в магнитно-резонансной томографии.

Ключевые слова: рак печени, магнетит железа, наночастицы железа, МРТ

Введение

В настоящее время во всем мире активно проводятся исследования магнитных наночастиц для решения диагностических и терапевтических задач наномедицины [1-3]: для усиления контраста и повышения чувствительности магнитно-резонансной томографии [4,5], для направленной доставки [6,7] и гипертермии с использованием магнитного поля [8,9].

Для применения магнитных наночастиц в медицине наиболее важной характеристикой является их стабильность и биосовместимость, именно это определяет характер взаимодействия наночастиц с биологическими объектами [10]. Для улучшения биосовместимости поверхность наночастиц модифицируют с использованием органических [11] и неорганических материалов [12-14]. Покрытие препятствует агрегации и окисления магнетита во время циркуляции наночастиц в кровотоке, что снижает их наночастиц.

Магнитные наночастицы на основе оксидов железа имеют более низкую токсичность по сравнению с аналогичными частицами на основе никеля, кобальта и других элементов, но в тоже время сохраняют достаточно эффективные магнитные свойства [15-16]. Магнетит является наиболее оптимальной кристаллографической модификацией оксида железа из-за его магнитных свойств, вследствие чего стали активно проводиться исследования для применения наночастиц магнетита в медицине в качестве контрастных агентов для МРТ и для магнитотермической терапии опухолей.

Для получения магнитных наночастиц используются различные химические методы [17-21]. В данной работе нами был использован метод синтеза цитрат-стабилизированных наночастиц магнетита путем осаждения солей двух- и трехвалентного железа в присутствии основания [22].

В литературе имеются работы, посвященные морфологическим изменениям во внутренних органах при различных методах введения непокрытых и покрытых магнитных наночастиц. В ряде работ показан умеренно выраженный токсический эффект непокрытых наночастиц [22-25], другие работы, посвященные модифицированным наночастицам магнетита, показали более низкую их токсичность для организма животных [26].

Цель: изучение морфологических изменений во внутренних органах и перевитой опухоли печени у крыс после однократного внутривенного введения цитрат-стабилизированных наночастиц магнетита и оценка возможности их применения для контрастирования в магнитно-резонансной томографии.

Материал и методы

Эксперименты на животных проводились на базе Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии. В исследовании использовались лабораторные белые беспородные крысы-самцы с перевитым раком печени РС-1 и наночастицы магнетита (Fe_3O_4 , 20 nm \pm 10), $Zp = -30$ mv, покрытые цитратной оболочкой. Работа с лабораторными животными осуществлялась в соответствии с международным руководством «International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals» [27] и рекомендациями комитета по этике СГМУ имени В.И. Разумовского.

Животные с перевитой опухолью печени РС-1 случайным образом были разделены на 3 группы – по 10 крыс в группе. Первой группе животных однократно внутривенно вводили раствор наночастиц магнетита в дозировке 20 мкг/кг веса; второй группе животных однократно внутривенно вводили наночастицы магнетита в дозировке 16 мг/кг. Третьей группе животных (группа сравнения) вводили однократно внутривенно 1мл физиологического раствора. Через сутки после введения наночастиц магнетита крысам проводилось магнитно-резонансная томография на высокопольном томографе Philips Achieva 1.5T с использованием фазированной катушки. Для наркоза животных использовали внутримышечные инъекции Золетила в дозе 40 мкг/кг веса животного.

Использовались быстрые «спин-эхо» протоколы (turbo spin echo – tse), взвешенные по T2 и по T1. Присутствие в исследуемом объекте контрастных веществ, таких как оксиды железа, уменьшает время поперечной релаксации T2 и обуславливает появление гипоинтенсивного сигнала на T2 взвешенных изображениях, что проявляется в более темном окрашивании накопивших контрастные вещества тканей.

После проведения МРТ все животные выводились из эксперимента путем декапитации, ткани внутренних органов и опухоли забирались для гистологических исследований, кроме того, проводился отбор образцов опухоли для определения концентрации железа на атомно-адсорбционном спектрофотометре (ААС).

Проводили стандартное морфологическое исследование тканей внутренних органов и опухоли с использованием окраски гематоксилином и эозином. Дополнительно проводилось иммуногистохимическое исследование маркера апоптоза в ткани опухоли с . Для дифференциальной диагностики гемосидерина и конгломератов наночастиц магнетита проводили реакцию Берлинской лазури (реакция Перлса).

Количественное определение содержания железа в ткани опухоли проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре Thermo Scientific iCE 3500 (Thermo Scientific, США) по интенсивности поглощения света с характерной длиной волны атомным паром определяемого элемента. Для Fe длина волны составляла 248,3 нм, ширина щели 0,2нм, ток лампы 75%. В качестве источника света использовали лампу полого катода. Для градуировки спектрометра использовались государственный стандартный образец ионов металлов ГСО 7330-96 (КС-1).

Исследовали следующие морфометрические показатели в органах – в печени: количество неизмененных гепатоцитов, количество гепатоцитов в состоянии дистрофии и некроза, количество лейкоцитов, количество непаренхиматозных элементов; в почках: высота эпителия извитых канальцев, периметр и площадь клубочков; в легких: толщина межалвеолярной перегородки, периметр и площадь перибронхиальных лимфоидных инфильтратов; в селезенке: толщина мантийной зоны во всех фолликулах, периметр и площадь лимфатических фолликулов и светлых центров.

Все морфометрические исследования и фотографирование проводились в 10 полях зрения при увеличении $\times 774$ с помощью Микровизора медицинского проходящего света μ Vizo-103 (ЛОМО).

Для обработки полученных в ходе исследований данных был использован пакет прикладных статистических программ «SPSS 17.0». Проверка соответствия формы распределения количественных признаков нормальному проводилась с помощью применения теста Колмогорова-Смирнова. Нулевую гипотезу отвергали в случае $p < 0,05$. Показатель достоверности различий (P) определялся с использованием критериев Стьюдента (t), различия оценивались как достоверные при вероятности 95% ($P < 0,05$) и выше.

Результаты

Через сутки после внутривенного введения наночастиц магнетита было отмечено увеличение массы печени и почек, что, вероятно, объясняется увеличением степени выраженности венозного полнокровия сосудов.

При гистологическом исследовании печени после внутривенного введения обеих дозировок наночастиц магнетита, наблюдали увеличение полнокровия центральных вен и снижение полнокровия синусоидов (в большей степени при дозировке 16 мг/кг), появление феномена сепарации крови, а также увеличение выраженности дистрофических изменений в гепатоцитах (рис. 1). Следует также отметить, что при морфологическом исследовании накопления наночастиц магнетита и гемосидерина не обнаруживалось.

При морфометрическом исследовании печени было установлено, что при дозе 20 мкг/кг снижается среднее количество клеток Купфера в п/зр в 1.3 раза, лимфоцитов – в 1.9 раз, по сравнению с группой сравнения. В то же время значительно увеличивалось количество гепатоцитов в состоянии некробиоза и некроза - в 7.6 раз.

При дозе 16 мг/кг отмечали достоверное увеличение среднего числа клеток Купфера в п/зр в 1.5 раза и снижение количества лимфоцитов в 5 раз по сравнению с группой сравнения. Число гепатоцитов в состоянии некробиоза и некроза увеличивалось в 4.1 раза по сравнению с группой животных без воздействия (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Морфометрические изменения в органах при внутривенном введении цитрат-стабилизированных наночастиц магнетита

Орган	Показатель	Контр. группа	Группа сравнения	Дозировка НЧ Fe 20 мкг/кг	Дозировка НЧ Fe 16 мг/кг
Печень	Клетки Купфера и Ито	8.37±2.7	8.9±0.523	6.82±0.47	13.27±0.89 **
	Лимфоциты	3.1±1.4	5.5±0.54	2.85±0.31 **	1.09±0.33 **
	Некротизированные гепатоциты	0.87±0.7	3.5±0.454	26.8±0.818 **	14.36±1.7 **
Легкие	S инфильтратов (мм ²)	0.017± 0.001	0.068± 0.00529	0.58±0.161 **	0.21±0.02 **
	Толщина межалвеолярных перегородок (мм)	0.0057± 0.0021	0.0092± 0.00062	0.0053± 0.000226 ***	0.011± 0.0006 *
	S клубочков (мм ²)	0.0032± 0.0001	0.0096± 0.00038	0.0063± 0.00016 ***	0.0073± 0.0005 ***
Почки	Высота эпителиоцитов (мм)	0.0094± 0.0001	0.0099± 0.00025	0.0179± 0.00031 ***	0.017± 0.00049 ***
	S фолликулов (мм ²)	0.107±0.016	0.167±0.018	0.136±0.019	0.22±0.027 ***
Селезенка	Толщина маргинальной зоны (мм)	8.37±2.7	0.0139± 0.0018	0.0189±0.0012 *	0.03±0.039 ***

Примечание: различия достоверны при сравнении значений опытной и контрольной групп при * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,005$, *** - $P < 0,001$

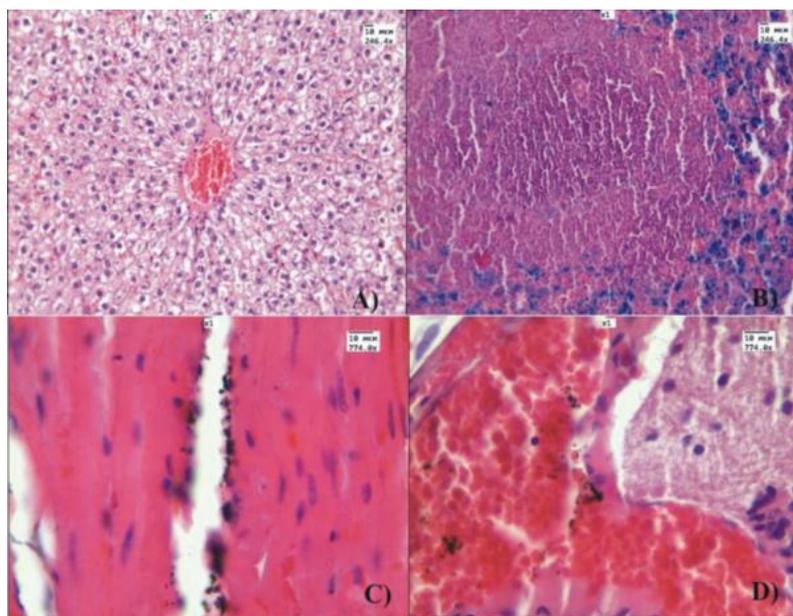


Рисунок 1. А) и В) Внутривенное введение наночастиц магнетита в дозе 20 мкг/кг: А) Печень. Гематоксилин и эозин, В) Селезенка. Реакция Перлса; С) и D) Внутривенное введение наночастиц магнетита в дозе 16 mg/kg: С) Миокард. Гематоксилин и эозин, D) Ткань мозга. Гематоксилин и эозин.

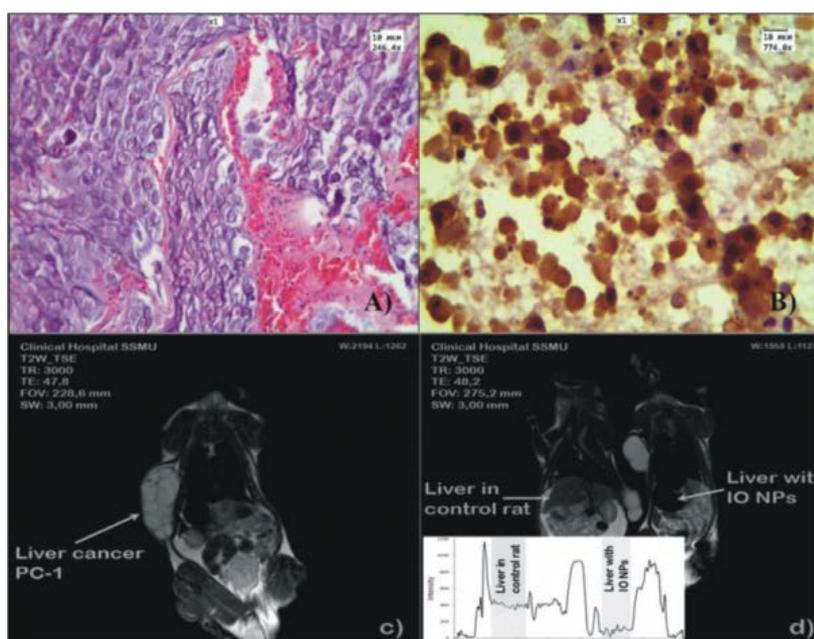


Рисунок 2. А) и В) Морфологические изменения перевитого рака печени при внутривенном введении наночастиц магнетита в дозировке 16 мг/кг: А) Гематоксилин и эозин. $\times 246,4$. В) Иммуногистохимическое окрашивание с антителом к p53. X 774. С) и D) T2-взвешенные МРТ-изображения через сутки после внутривенного введения наночастиц магнетита в дозе 16 мг/кг, D) слева - животное из группы без воздействия, справа животное через сутки после внутривенного введения наночастиц магнетита.

В легких как при дозировке наночастиц магнетита 20 мкг/кг, так и при 16 мг/кг, обнаруживалось увеличение количества полнокровных сосудов крупного и среднего калибра, а также выраженности эмфиземы по сравнению с группой животных без воздействия. В 25% случаев развивался феномен сепарации крови. При анализе гистологических данных было отмечено, что при дозе 20 мкг/кг происходит истончение межальвеолярных перегородок легких по сравнению с группой животных без воздействия и увеличение площади лимфоидных инфильтратов вокруг бронхов в 8,5 раз. При дозе 16 мг/кг обнаруживалась та же тенденция, однако площадь перибронхиальных инфильтратов увеличивалась только в 3 раза (табл. 1.).

В селезенке при внутривенном введении наночастиц магнетита независимо от дозы мы наблюдали преобладание красной пульпы над белой в соотношении 2:1. В красной пульпе было выражено полнокровие. При проведении реакции Берлинской лазури в центре только одного из фолликулов и в красной пульпе обнаруживали скопления положительно окрашенного Fe^{3+} . При этом все фолликулы имели менее четко оформленные контуры при дозировке 20 мкг/кг. В фолликулах обнаруживали единичные светлые активные центры площадью в среднем до $0,008 \text{ мм}^2$ при дозе 20 мкг/кг и $0,014 \text{ мм}^2$ при дозе 16 мг/кг, что свидетельствует об активации Т-зависимой зоны. Кроме того выявили достоверное увеличение толщины мантийной зоны в среднем на 35% и

115%, соответственно при дозах 20 мкг/кг и 16 мкг/кг, по сравнению с группой сравнения. Не обнаружили значимого изменения размеров самих фолликулов (табл. 1, рис. 1).

В сердце независимо от дозы при внутривенном введении наночастиц магнетита выявляли выраженное полнокровие сосудов среднего и малого калибра, умеренный отек миокарда, отмечали скопление черных гранул между кардиомиоцитами (рис. 1).

В веществе головного мозга при введении обеих доз наночастиц магнетита выявляли отек, полнокровие сосудов, преимущественно сосудов мягкой мозговой оболочки. В просвете сосудов появлялись мелкие гранулы черного цвета, что не встречалось в группе сравнения, а также пролиферация клеток эндими и диффузные, без четкой локализации дистрофические изменения клеток вещества головного мозга: набухание гигантских клеток Беца в ганглионарном слое коры головного мозга (рис. 1). В мозжечке во всех случаях патологических изменений не было выявлено.

Через сутки после внутривенного введения наночастиц магнетита в дозе 20 мкг/кг в перевитой опухоли видимые изменения не были отмечены. При внутривенном введении дозировки 16 мкг/кг наблюдали увеличение площади некрозов опухолевой ткани (до 90%) и выраженное полнокровие сосудов (рис. 2).

При иммуногистохимическом исследовании после внутривенного введения наночастиц магнетита мы не обнаружили значимых изменений в ткани опухоли со стороны экспрессии маркера апоптоза p53 (рис. 2).

При проведении МРТ-исследования только при дозе наночастиц магнетита 16 мкг/кг в печени проявился эффект контрастирования. Присутствие наночастиц в печени уменьшает время спин-спиновой релаксации протонов, что приводит к уменьшению интенсивности МР сигнала от печени на T2-взвешенных томограммах. (рис. 2).

При проведении атомно-адсорбционной спектроскопии было установлено, что при дозировке наночастиц 20 мкг/кг содержание железа в опухоли составило $0,279 \pm 0,083$ мг/г, а при дозировке 16 мкг/кг – $0,436 \pm 0,065$ мг/г.

Обсуждение

При внутривенном введении наночастиц магнетита у животных отметили развитие дистрофических процессов в печени. Нельзя исключить, что данные изменения могут быть обусловлены как нарушением кровообращения за счет циркуляции в просвете сосудов наночастиц магнетита, так и за счет интоксикации вследствие роста перевитой опухоли. Необходимо отметить, что ряд авторов описывают схожие изменения в печени при внутривенном введении наночастиц магнетита: расширение желчных и синусоидных капилляров печени, полнокровие центральной вены и краевое стояние лейкоцитов [28,29].

В почках развиваются дистрофические изменения в эпителии извитых канальцев, вероятно, обусловленные наличием интоксикации из-за растущей перевитой опухоли. Другие авторы изучавшие морфологию почек крыс при внутривенном введении наночастиц магнетита, отмечали также полнокровие сосудов мозгового вещества и расширение капсулы Шумлянско-Боумана, которого в нашем эксперименте мы не наблюдали, что может быть это обусловлено различием в размерах и покрытии наночастиц [29,30].

Выявленные изменения в легких и селезенке свидетельствуют об активации иммунных процессов при внутривенном введении наночастиц магнетита, что совпадает с данными ряда авторов [31, 32].

При количественном определении содержания железа методом атомно-адсорбционной спектроскопии через сутки после внутривенного введения наночастиц магнетита было выявлено накопление железа неэндогенного происхождения в ткани опухоли, при этом не отмечалось выраженных изменений опухолевых клеток по сравнению с группой животных без воздействия.

Заключение

Установлено, что внутривенное введение цитрат-стабилизированных наночастиц магнетита только при дозировке 16 мкг/кг приводит к нарушению кровенаполнения в органах, в основном за счет полнокровия, при этом отмечаются дистрофические повреждения клеток в двух основных органах детоксикации: печени и почках. Установлено иммуностимулирующее действие наночастиц магнетита на белую пульпу селезенки и перибронхиальные лимфоидные фолликулы. При внутривенном введении наночастиц магнетита только при дозировке 16 мкг/кг через сутки выявлено накопление наночастиц в опухоли (по данным МРТ и ААС). Полученные результаты свидетельствуют, что предложенная стратегия внутривенного введения цитрат-стабилизированных наночастиц магнетита является эффективной и перспективной для использования в магнито-резонансной томографии.

Литература

1. Laurent S., Forge D., Port M., Robic C., Vander Elst L., Muller R.N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. //Chem. Rev. 2008. V.108. P. 2064 .
2. German S.V., Inozemtseva O.A., Anis'kov A.A., Volkova E.K., Terentyuk G.S., Gorin D.A., Navolokin N.A., Zuev V.V., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Kuznetsova N.R., Vodovozova E.L., Fakhrullin R.F. Liposomes loaded with hydrophilic magnetite nanoparticles: preparation and application as contrast agents for magnetic resonance IMAGING. //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015. V. 135. P. 109-115
3. De Mrinmoy, Ghosh P. S., Rotello V. M. Applications of Nanoparticles in Biology. //Advanced Materials. 2008. V.20. P.4225.
4. Neumaier C.E., Baio G., Ferrini S., Corte G., Daga A. MR and iron magnetic nanoparticles. Imaging opportunities in preclinical and translational research. //Tumori. 2008. V94(2). P.226-233.
5. Jin R., Lin B., Li D. H. Al Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: design considerations and clinical applications. //Curr Opin Pharmacol. 2014. V.18. P.18-27.
6. Gupta A.K., Curtis A.S.G. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. //Biomaterials. 2004. V.25, P.3029.
7. Kievit F.M., Zhang M. Surface engineering of iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. //Acc Chem Res. 2011. V.44. №10. P.853-862.
8. Kobayashi T. Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles.// Biotechnol J. 2011. V.6 № 11. P. 1342-1347.
9. Laurent S., Dutz S., Häfeli U.O., Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. //Adv Colloid Interface Sci. 2011. V.166 (1-2). P.8-23.
10. Наволокин Н.А., Матвеева О.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Сулейманова Л.В., Кун С.М., Медведев Б.А., Игнатьев А.А., Бочкарёва Т.В. Морфологические изменения во внутренних органах лабораторных животных при однократном введении наночастиц Fe. //Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2011. Т. 11. № 2. С. 62-66.
11. Massia S.P., Stark J., Letbetter D.S. Surface immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. //Biomaterials. 2000. V.21. P.2253.

12. Yu. J, Lee C.-W., Im S.-S., Lee J.-S. Structure and magnetic properties of SiO₂ coated Fe₂O₃ nanoparticles synthesized by chemical vapor condensation process. //Rev. Adv. Mater. Sci. 2003. V.4. P.55.
13. Chen M., Yamamuro S., Farrell D., Majetich S.A. Gold-coated iron nanoparticles for biomedical applications. //J. Appl. Phys. 2003. V.93. P.7551.
14. Lin J., Zhou W., Kumbhar A., Fang J., Carpenter E.E., O'Connor C.J. Gold-coated iron (Fe@Au) nanoparticles: synthesis, characterization, and magnetic field-induced self-assembly.// J. Solid State Chem. 2001. V. 159. P. 26.
15. Lubbe A.S., Alexiou C., Bergemann C. Clinical applications of magnetic drug target-ing.// J. Surg. Res. 2001. V.95. P. 200.
16. Kaminski M.D., Rosengart A.J. Detoxification of blood using injectable magnetic na-noparticles: a conceptual technology description.// J. Magn. Magn. Mater. 2005. V.293. P. 389.
17. Chin A.B., Yaacob I.I. Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nano-particles via microemulsion and massart's procedure. //J. Mater. Process Technol. 2007. V.191. P.235.
18. Albornoz C., Jacobo S.E. Preparation of a biocompatible magnetic film from an aque-ous ferrofluid.// J. Magn. Magn. Mater. 2006. V.305. P.12.
19. Kim E.H., Lee H.S., Kwak B.K., Kim B.K. Synthesis of ferrofluid with magnetic na-noparticles by sonochemical method for MRI contrast agent. //J. Magn. Magn. Mater. 2005. V.289, P.328.
20. Wan J., Chen X., Wang Z., Yang X., Qian Y. A soft-template-assisted hydrothermal approach to single-crystal Fe₃O₄ nanorods. J. Cryst. Growth. 2005. V.276. P. 571.
21. Свенская Ю.И., Наволокин Н.А., Бучарская А.Б., Терентюк Г.С., Кузьмина А.О., Бурашникова М.М., Маслякова Г.Н., Лукьянец Е.А., Горин Д.А. Микрочастицы карбоната кальция, содержащие фотосенсибилизатор «фотосенс»: получение, дистанционное высвобождение красителя ультразвуком, in vivo применение.// Российские нанотехнологии. 2014. Т. 9. № 7-8. С. 45-52.
22. Герман С.В., Иноземцева О.А., Наволокин Н.А., Пудовкина Е.Е., Зуев В.В., Волкова Е.К., Бучарская А.Б., Плескова С.Н., Маслякова Г.Н., Горин Д.А. Синтез гидрозолей магнетита и оценка их воздействия на живые системы на клеточном и тканевом уровнях при использовании МРТ и морфологических методов исследования. //Российские нанотехнологии. 2013. Т. 8. № 7-8. С. 128-133.
23. Navolokin N.A., Matveeva O.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Suleimanova L.V., Kun S.M., Medvedev B.A., Ignatiev A.A., Bochkareva T.V. Morphological changes in the internal organs of laboratory animals after a single dose of nanoparticles Fe. //Proceedings of the Saratov State University. Series Physics. 2011. V.11. P. 62-66.
24. 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.
25. Navolokin N.A., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Kong X.M., Medvedev B.A., Ignatiev A.A., Bochkaryeva T.V., Zuev V.V. Morphological changes in the kidney, liver and spleen during prolonged administration of iron nanoparticles //Journal of Physics: Conference Series. 2012. T. 345. 1. P.012043.
26. Prodan A.M., Iconaru S.L., Ciobanu C.S., Chifiriuc M.C., Stoicea M., Predoi D. Iron oxide magnetic nanoparticles: characterization and toxicity evaluation by in vitro and in vivo assays. // Journal of Nanomaterials. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/587021>
27. 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....](http://www.cioms.ch/index.php/12-newsflash/227-cioms-and-iclas-release-t...)
28. Tarakhovsky Y.S. Intelligent lipid nanocontainers in targeted delivery of drugs. Moscow. LCI Publisher. 2011. P.280.
29. Pershin A.G., Sazonov A.E., Milto I.V. The use of magnetic nanoparticles in biomedicine // Bulletin of the Siberian medicine. 2008. V.2. P.70-78.
30. Milto I.V., Mikhailov G.A., Ratkin A.V., Magaeva A.A. Influence of nanoparticles on the morphology of internal organs of mice with intravenous solution Fe₃O₄ nanopowders.// Bulletin of the Siberian medicine. 2008. V.1 P. 32-36.
31. Park E.J., Oh S.Y., Lee S.J., Lee K., Kim Y., Lee B.S., Kim J.S. Chronic pulmonary accumulation of iron oxide nanoparticles induced Th1-type immune response stimulating the function of antigen-presenting cells //Environ Res. 2015. Nov;143(Pt A):138-47. doi: 10.1016/j.envres.2015.09.030. Epub 2015 Oct 19.
32. Bucharskaya A.B., Pakhomy S.S., Zlobina O.V., Maslyakova G.N., Matveeva O.V., Bugaeva I.O., Navolokin N.A., Khlebtsov B.N., Bogatyrev V.A., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V. Alterations of morphology of lymphoid organs and peripheral blood indicators under the influence of gold nanoparticles in rats.//Journal of Innovative Optical Health Sciences. 2016, Vol.9, No.1. 1640004 (10 pages).