

МОНОНУКЛЕАРНЫЕ ФАГОЦИТЫ ПЕЧЕНИ И ЛЕГКОГО КРЫСЫ ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ СУСПЕНЗИИ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ МАГНЕТИТА

© И. В. Мильто,^{1, 2} И. В. Суходоло,¹ В. Ю. Усов³

¹ ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ,

² ФГБОУ ВПО Национальный исследовательский Томский политехнический университет

и ³ Научно-исследовательский институт кардиологии СО РАМН, Томск;

электронный адрес: milto_bio@mail.ru

Описаны изменения морфологии и внутриорганической локализации клеток системы мононуклеарных фагоцитов печени и легкого крыс в различные сроки после однократного и многократного внутривенных введений супензии немодифицированных наноразмерных частиц магнетита (НЧМ). Проиллюстрирован один из возможных механизмов выведения НЧМ из организма крысы с участием мононуклеарных фагоцитов печени (выход звездчатых макрофагов в желудочно-кишечный тракт через желчевыделительные пути) и легкого (миграция макрофагов в просвет бронхиального дерева). Обсуждается возможность выведения НЧМ другими механизмами, например с помощью метаболизирования в лизосомах по аналогии с описанными в литературе преобразованиями наночастиц другого качественного состава. Показано, что внутривенное введение НЧМ вызывает изменения морфологии внутренних органов крыс, выраженность которых усиливается с увеличением суммарной дозы введенного магнетита. Наноразмерный магнетит обнаруживается в печени и легком крыс спустя 40 сут после однократного внутривенного введения.

Ключевые слова: наноразмерные частицы магнетита, звездчатые (клетки Купфера) и альвеолярные макрофаги.

Принятые сокращения: МНФ — мононуклеарные фагоциты, МРТ — магнитно-резонансная томография, НЧМ — наноразмерные частицы магнетита.

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 (Lubbe et al., 1999; Pankhurst et al., 2003; Martina et al., 2005; Rosi, Mirkin, 2005). Особое место среди неорганических наноматериалов занимают магнитные наноматериалы, из которых наиболее хорошо изучены суперпарамагнитные частицы оксида железа (Weissleder et al., 1990; Zhang et al., 2002; Ito et al., 2003).

Преобладающее количество работ посвящено изучению свойств наноматериалов *in vitro*, в то время как публикаций о влиянии различных видов наноматериалов на уровне организма сравнительно немного (Jani et al., 1994; Krotz et al., 2003; Pankhurst et al., 2003). Недостаточно изучены фармакокинетика и фармакодинамика наноматериалов, неоднозначно определены органы-мишени, характер вызываемых в них изменений, механизмы защитных и компенсаторно-приспособительных реакций, вызываемых в организме после применения наноматериалов.

Целью работы явилось изучение динамики клеток системы МНФ печени и легкого крыс в различные сроки после внутривенного введения супензии наноразмерных частиц магнетита (НЧМ).

Материал и методика

НЧМ, используемые в работе, получены механохимическим способом в отделе структурной макрокинетики Томского научного центра СО РАН. Из НЧМ готовили супензию в водно-солевом стабилизирующем растворе, содержащем хлорид натрия, цитрат натрия (РЕАХИМ, Россия) и НЕРЕС (AppliChem GmbH, Германия) (Martina et al., 2005). Полученную супензию подвергали сонификации на дезинтеграторе УЗДН-2Т, после чего центрифугировали в гравитационном поле (500 g, 5 мин). Супернатант фильтровали через поликарбонатные фильтры (Sartorius, Германия) с диаметром пор 100 нм под избыточным давлением аргона. Концентрацию НЧМ в стабилизирующем растворе определяли рентгено-флуоресцентным методом на спектрометре Quant'X. Распределение частиц магнетита по размерам в супензии устанавливали на лазерном анализаторе размерности Zetasizer nano zs. Форму и структуру частиц в растворе устанавливали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100 CX II.

Исследование проводили на 75 беспородных крысах-самцах (со средней массой 150 г), из которых были сформированы 4 группы: 1-я группа (15 крыс) — интактные животные; 2-я группа (15 крыс) — контрольные животные, которым многократно (каждые 2 сут) вводили по

2 мл стабилизирующего раствора в хвостовую вену; 3-я (25 крыс) и 4-я (20 крыс) группы — животные, которым соответственно однократно и многократно (каждые 2 сут) внутривенно вводили стандартизированную суспензию магнетита (2 мл) из расчета 0.1 г НЧМ на 1 кг массы тела животного.

Магнитно-резонансную томографию (МРТ) внутренних органов крыс проводили на сканере Toshiba Vantage с индукцией поля 1.5 Т на 1-е и 40-е сут после однократного введения, а также на 40-е сут после многократного внутривенного введения суспензии НЧМ. За период наблюдения спонтанной гибели животных не отмечали. Выведение животных из эксперимента проводили методом декапитации под эфирным наркозом через 1, 7, 14, 21 и 40 сут после инъекции, взятие материала у животных всех групп производили в одни и те же сроки. Крысы 4-й группы выводили из эксперимента начиная с 7-х сут эксперимента. Суммарная доза НЧМ в группе с многократным введением составила на 7-е сут 300 мг НЧМ на 1 кг массы тела (3 инъекции), на 14-е сут — 600 мг/кг (6 инъекций), на 21-е сут — 1 г/кг (10 инъекций) и на 40-е сут — 2 г/кг (20 инъекций).

Фрагменты печени и легкого фиксировали в забуференном фомалине, pH 7.4 (БиоВитрум, Россия). Проводку и заливку в парафин материала для гистологического и гистохимического исследований осуществляли, как описано в литературе (Саркисов, 2002). С целью идентификации в тканях ионов Fe^{3+} , которые входят в состав НЧМ, использовали гистохимическую реакцию с ферроцианидом калия (РЕАХИМ, Россия) по методу Перлса. Срезы, окрашенные по методу Перлса, затем докрашивали гематоксилином Гарриса и эозином (БиоВитрум, Россия) (Саркисов, 2002).

Морфометрию срезов печени и легких проводили с помощью объект-микрометра, используя окуляр $10\times$ и объектив $20\times$ (0.45). Общее количество Перлс-положительных макрофагов и их отдельных классов рассчитывали на 1 mm^2 ткани соответствующего органа. На препаратах печени и легкого подсчитывали общее количество Перлс-позитивных макрофагов и их отдельных классов. В зависимости от количества гранул в цитоплазме Перлс-позитивных макрофагов выделяли три морфологических класса: 1-й класс — макрофаги, цитоплазма которых переполнена Перлс-позитивными гранулами (более 30 в клетке); 2-й класс — макрофаги, умеренно нагруженные Перлс-позитивными гранулами; 3-й класс — макрофаги, имеющие единичные Перлс-позитивные гранулы в цитоплазме (не более 5 в клетке).

Статистическую обработку результатов производили с помощью пакета программ SPSS 11.5. Результаты представлены в виде среднего значения и его ошибки ($X \pm S_x$). Распределение на соответствие нормальному проверяли с помощью критерия Шапиро—Уилкса. Так как распределение соответствовало нормальному, для выяснения достоверности различий средних значений морфометрических показателей между экспериментальными группами использовали t -тест для независимых выборок (тест Стьюдента) и t -тест для зависимых выборок.

Результаты

Частицы магнетита в стабилизирующем растворе имеют преимущественно сферическую форму и представлены как отдельными частицами, так и их агрегата-

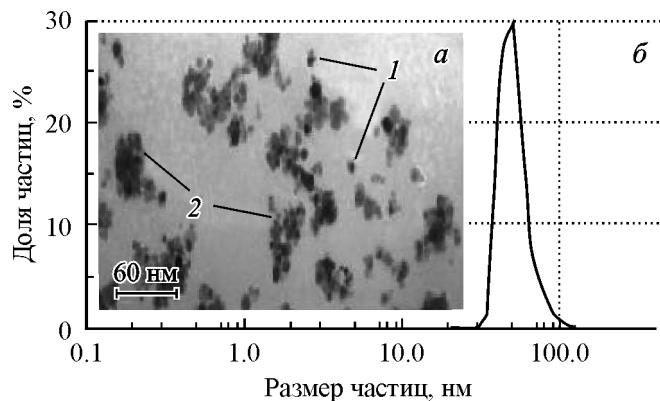


Рис. 1. Суспензия наноразмерного магнетита.

а — отдельные наноразмерные частицы (1) и их агрегаты (2) в стабилизирующем растворе; трансмиссионная электронная микроскопия. *б* — распределение по размерам частиц суспензии магнетита (Nanosizer nano ZS) в стабилизирующем растворе.

ми. Средний размер свободных частиц составляет 10 нм, размер агрегатов не превышает 100 нм (рис. 1). Концентрация НЧМ в полученной суспензии составила 7 мг/мл. Суспензия была седиментационно устойчива в течение 3 сут.

На томограммах крыс после однократного введения суспензии НЧМ отмечаются искажение сигнала и ухудшение изображения в области эпигастрия. Наиболее сильно сигнал искажен в области печени и селезенки. К 40-м сут после однократного внутривенного введения суспензии НЧМ качество изображения нормализуется.

МРТ крыс на 40-е сут после многократного внутривенного введения суспензии НЧМ выявила значительное накопление суперпарамагнитных частиц в печени, легком и селезенке животных (рис. 2). Структура изученных органов крыс после внутривенного введения стабилизирующего раствора имеет обычное строение и не отличается от таковой интактных крыс в аналогичные сроки. Реакция Перлса на препаратах печени и легкого животных интактной и контрольной групп была отрицательной, а в селезенке крыс этих двух групп — положительной.

В печени крыс после однократного внутривенного введения суспензии НЧМ в ранние сроки (1, 7 и 14 сут) наблюдается изменение тинкториальных свойств гепатоцитов, проявляющееся в усилении эозинофилии цитоплазмы этих клеток в перипортальных и промежуточных отделах печеночных долек. Здесь же встречаются некротизированные гепатоциты (моноцеллюлярный некроз). Артерии портальных трактов спазмированы, центральные и поддольковые вены полнокровны. Синусоиды в центральных и промежуточных отделах долек расширены. Перипортальные отделы синусоидов спавшиеся. Начиная с 7-х сут гепатоциты промежуточных и перипортальных отделов печеночных долек находятся в состоянии баллонной дистрофии (рис. 3). К концу эксперимента (21 и 40 сут) выраженность описанных выше гемодинамических и органических изменений стромальных и паренхиматозных элементов печени снижается. При многократном введении суспензии НЧМ описанные выше изменения более выражены и нарастают к 14-м сут, после чего стабилизируются и сохраняются в течение всего эксперимента.

В легком животных как после однократного, так и после многократного введения суспензии НЧМ наблюдает-

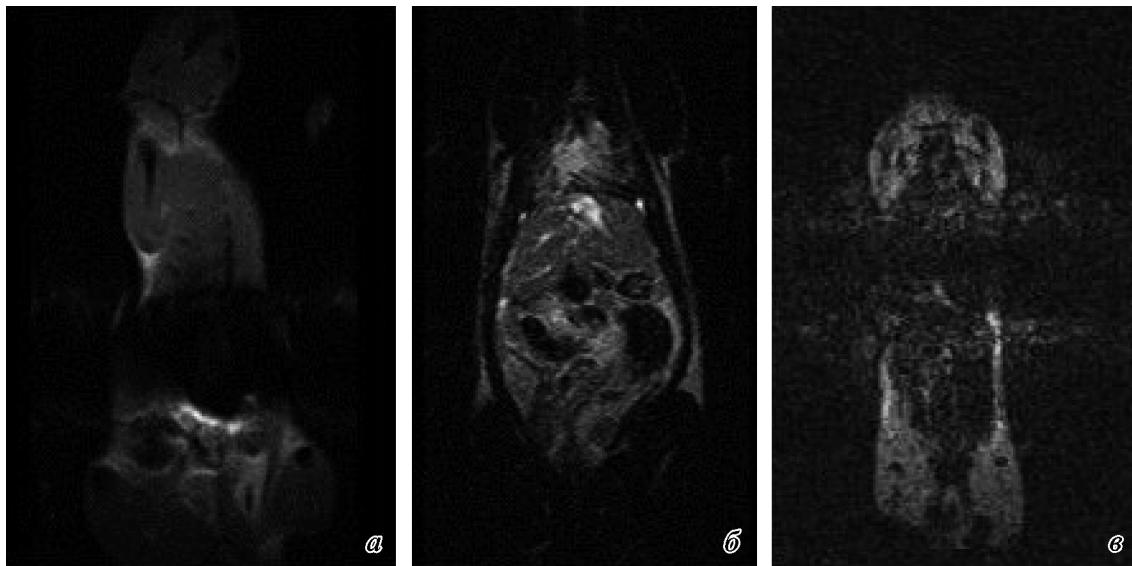


Рис. 2. Магнитно-резонансная томография крыс после однократного (а, б) и многократного (в) внутривенных введений наноразмерных частиц магнетита (НЧМ).

а, б — соответственно через 1 и 40 сут после введения; в — 40 сут после введения (суммарная доза 2 г НЧМ на 1 кг массы тела крысы).

ся только комплекс дисциркуляторных расстройств, который выражается в расширении межальвеолярных перегородок и полнокровии сосудов микроциркуляторного русла. Артериальные сосуды спазмированы, вены расширены, полнокровны, отмечается периваскулярный отек. Эти изменения полностью нивелируются к 40-м сут после однократного введения (рис. 4). В группе животных с многократным введением подобные изменения прогрессируют к 14-м сут, после чего стабилизируются и сохраняются до конца эксперимента.

В печени животных через 1 сут после однократного введения суспензии НЧМ в синусоидах на всем протяжении печеночных долек выявляются клетки Купфера (звездчатые макрофаги), которые дают положительную реакцию Перлса. На этом сроке в печени крыс преобладают клетки 3-го класса, которые локализуются главным обра-

зом в перипортальных и промежуточных отделах печеночных долек.

На 7-е сут в печени отмечается перераспределение внутри дольки Перлс-позитивных клеток Купфера, представленных главным образом клетками 2-го класса. В перипортальных отделах дольки преобладают Перлс-позитивные клетки 1-го класса. Общее количество Перлс-позитивных клеток снижается относительно предыдущего срока (рис. 3). На 14, 21 и 40-е сут эксперимента в печени встречаются Перлс-позитивные клетки всех трех классов, в синусоидах и в области триад выявляется примерно одинаковое количество Перлс-позитивных клеток Купфера 2-го и 3-го классов.

В легких животных, выведенных из эксперимента через 1 сут после однократного внутривенного введения НЧМ, встречаются Перлс-позитивные макрофаги (интер-

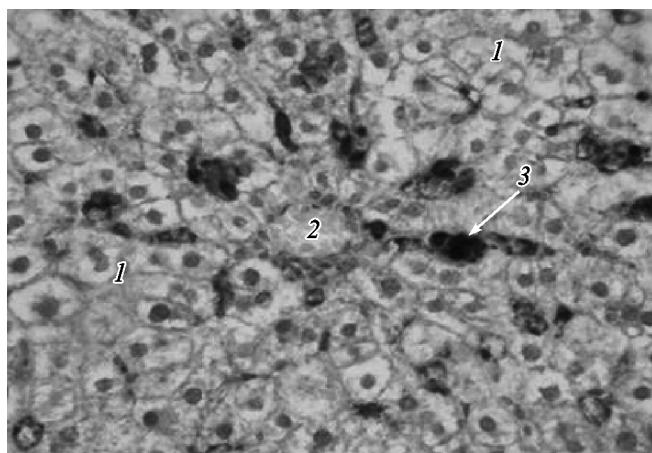


Рис. 3. Печень крысы через 7 сут после однократного внутривенного введения суспензии магнетита.

1 — гепатоциты перицентральных и промежуточных отделов печеночных долек в состоянии баллонной дистрофии, 2 — полнокровие центральных вен, 3 — перисинусоидальное расположение Перлс-позитивных клеток. Реакция Перлса с докраской гематоксилином и эозином. Об. 20×.

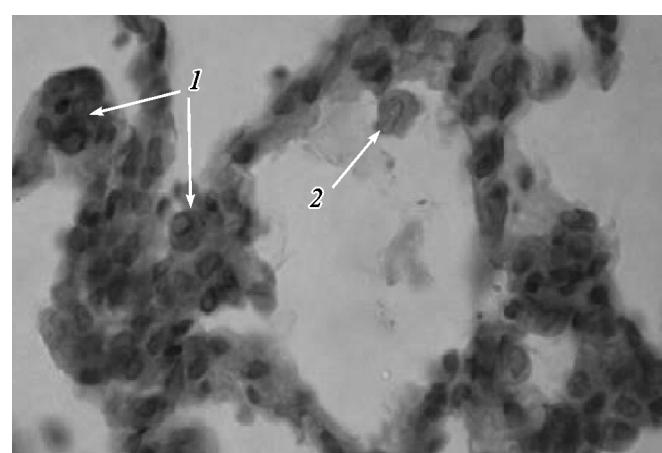


Рис. 4. Легкое крысы на 40-е сут после однократного внутривенного введения суспензии магнетита.

Перлс-позитивные макрофаги в межальвеолярных перегородках (1) и в просвете альвеол (2). Реакция Перлса с докраской гематоксилином и эозином. Об. 20×.

Таблица 1

Динамика количества Перлс-позитивных клеток Купфера в 1 мм² ткани печени крысы при однократном и многократном внутривенных введениях суспензии наноразмерных частиц магнетита в различные сроки наблюдения

Срок, сут	Однократное введение				Многократное введение			
	общее число макрофагов	число клеток 1-го класса	число клеток 2-го класса	число клеток 3-го класса	общее число макрофагов	число клеток 1-го класса	число клеток 2-го класса	число клеток 3-го класса
1	284.0 ± 5.1	42.0 ± 3.6	106.0 ± 1.9	136.0 ± 2.0	—	—	—	—
7	217.2 ± 4.9 ^a	35.0 ± 1.7	98.8 ± 3.4	83.4 ± 1.9 ^a	597.6 ± 7.9	197.2 ± 3.6	250.6 ± 3.7	149.8 ± 2.7
14	191.8 ± 4.1 ^{a, б}	31.2 ± 1.8	81.4 ± 3.0 ^{a, б}	79.2 ± 1.3 ^б	522.4 ± 11.5 ^a	271.0 ± 4.5 ^a	193.0 ± 6.5 ^a	58.4 ± 4.2 ^a
21	133.2 ± 1.4 ^{a, б}	19.2 ± 1.0 ^{a, б}	58.2 ± 1.2 ^{a, б}	65.8 ± 1.8 ^{a, б}	515.0 ± 8.2 ^б	303.6 ± 7.3 ^{a, б}	180.0 ± 3.7 ^б	31.4 ± 2.4 ^{a, б}
40	48.4 ± 3.3 ^{a, б}	9.6 ± 1.1 ^{a, б}	20.0 ± 0.8 ^{a, б}	18.8 ± 2.0 ^{a, б}	482.8 ± 6.5 ^б	352.2 ± 4.2 ^{a, б}	121.0 ± 3.1 ^{a, б}	10.6 ± 1.3 ^{a, б}

Примечание. Здесь и в табл. 2 приведены средние величины и их ошибки. 1-й класс — макрофаги, переполненные Перлс-позитивными гранулами (более 30); 2-й класс — макрофаги, умеренно нагруженные гранулами; 3-й класс — макрофаги с единичными гранулами (не более 5).

^aОтличие от величины в предыдущий срок (при $P < 0.05$). ^бОтличие от величины в 1-е сут для клеток группы с однократным и на 7-е сут для клеток группы с многократным введением (при $P < 0.05$).

стициальные макрофаги), главным образом 2-го класса, которые выявляются периваскулярно. На 7-е сут периваскулярно и перибронхиально расположены скопления интерстициальных макрофагов всех трех классов, среди которых преобладают клетки 2-го класса.

На 14-е сут Перлс-позитивные макрофаги обнаруживаются в просвете альвеол и бронхов, а также перибронхиально и периальвеолярно. В целом Перлс-позитивные клетки меньше, чем на 7-е сут, и они представлены преимущественно клетками 2-го класса. На 21-е и 40-е сут после однократного введения НЧМ в межальвеолярных перегородках сохраняется небольшое количество Перлс-позитивных макрофагов, преобладающим классом являются клетки с умеренным количеством гранул в цитоплазме (рис. 4).

При многократном введении НЧМ на 7-е сут после начала эксперимента на всем протяжении синусоидов печеночных долек выявляются Перлс-позитивные клетки Купфера. На перipherии печеночной дольки определяется большое количество клеток Купфера, главным образом 1-го и 2-го классов.

На 14-е сут в перипортальных отделах синусоидов и в области портальных трактов имеются скопления Перлс-позитивных клеток всех трех классов с преобладанием 1-го. На 21-е и 40-е сут Перлс-позитивные макрофаги скапливаются в перипортальных отделах печеночных долек и представлены главным образом клетками Купфера 1-го класса.

В легких животных, выведенных из эксперимента через 7 сут и получивших 3 инъекции НЧМ, интерстициаль-

ные макрофаги выявляются периваскулярно и перибронхиально, они представлены в основном клетками 2-го класса. На 14-е и 21-е сут у крыс с многократным введением суспензии НЧМ в просвете альвеол, бронхов, периальвеолярно и перибронхиально расположены скопления Перлс-позитивных макрофагов 1-го и 2-го классов с преобладанием клеток 2-го класса. На 40-е сут после многократного введения НЧМ в строме легкого и в просвете альвеол Перлс-позитивные макрофаги представлены главным образом клетками 1-го и 2-го классов.

После однократного внутривенного введения суспензии НЧМ в печени крыс в течение 1—40 сут наблюдается уменьшение общего количества Перлс-позитивных макрофагов (клеток Купфера) (табл. 1). Количество отдельных классов клеток Купфера также снижается к 40-м сут.

После многократного введения суспензии НЧМ (от 3 до 20 инъекций) в печени крыс также наблюдается снижение общего количества Перлс-позитивных клеток к 40-м сут (табл. 1). Динамика этого снижения выражена не так явно, как после однократного введения. С увеличением дозы вводимого магнетита количество фагоцитов 1-го класса возрастает, а количество клеток 2-го и 3-го классов снижается. После однократного внутривенного введения суспензии НЧМ в течение 1—40 сут в легком крыс наблюдается снижение количества Перлс-позитивных клеток (интерстициальных макрофагов) (табл. 2). Количество отдельных классов альвеолярных макрофагов также снижается к концу эксперимента, особенно быстро уменьшается количество макрофагов 3-го класса. При многократном введении суспензии НЧМ (от 3 до

Таблица 2

Динамика количества Перлс-позитивных макрофагов в 1 мм² ткани легкого крысы при однократном и многократном внутривенных введениях суспензии наноразмерных частиц магнетита в различные сроки наблюдения

Срок, сут	Однократное введение				Многократное введение			
	общее число макрофагов	число клеток 1-го класса	число клеток 2-го класса	число клеток 3-го класса	общее число макрофагов	число клеток 1-го класса	число клеток 2-го класса	число клеток 3-го класса
1	75.2 ± 3.2	14.8 ± 1.0	39.6 ± 1.8	20.8 ± 1.4	—	—	—	—
7	47.0 ± 1.3 ^a	9.4 ± 0.8 ^a	29.2 ± 1.5	8.4 ± 0.6 ^a	166.2 ± 12.2	26.8 ± 0.9	101.0 ± 4.0	49.8 ± 1.8
14	39.4 ± 2.6 ^б	9.4 ± 1.2 ^б	20.0 ± 1.4 ^{a, б}	10.0 ± 1.4 ^б	149.4 ± 1.4	49.6 ± 2.0 ^a	79.6 ± 2.9 ^a	20.2 ± 1.8 ^a
21	25.6 ± 1.6 ^{a, б}	5.2 ± 1.2 ^б	19.8 ± 1.3 ^б	0.6 ± 0.4 ^{a, б}	92.4 ± 1.9 ^{a, б}	30.6 ± 1.5 ^a	50.6 ± 2.4 ^{a, б}	11.4 ± 1.2 ^{a, б}
40	13.6 ± 0.7 ^{a, б}	4.4 ± 0.8 ^б	9.6 ± 0.9 ^{a, б}	0 ^б	63.2 ± 0.8 ^{a, б}	29.6 ± 1.9	29.4 ± 2.1 ^{a, б}	4.2 ± 0.7 ^{a, б}

20 инъекций) в легких крыс к 40-м сут также наблюдается снижение общего количества Перлс-позитивных клеток (табл. 2).

Обсуждение

Искажение МРТ сигнала связано с физическими свойствами используемых НЧМ (Найден и др., 2006). Частицы магнетита, являясь суперпарамагнетиками, создают при МРТ-исследовании собственное магнитное поле, которое взаимодействует с магнитным полем, приложенным к организму, и препятствуют получению качественного сигнала (Vonnemain, 1998; Martina et al., 2005). Накопление НЧМ в печени, легком и селезенке объясняется развитой системой МНФ этих органов.

Нормализация качества томограмм к 40-м сут после однократного внутривенного введения суспензии НЧМ обусловлена снижением содержания частиц магнетита в исследуемых органах (печени и легком), которое может быть связано как с выведением наноматериала из организма крыс, так и с его метаболизированием. Метаболизм наноматериалов может реализовываться различными способами. Так, изменение поверхностного заряда полилактидных наночастиц, происходящее в условиях кислой среды внутри лизосом, способствует их высвобождению из лизосом и накоплению в цитоплазме (Panyam et al., 2002). Например, кварцевые наночастицы повышают проницаемость мембран лизосом альвеолярных макрофагов (Thibodeau et al., 2004). Наиболее вероятным механизмом метаболизации железосодержащих наноразмерных частиц является их растворение в кислой среде лизосом после их интернализации по механизму эндоцитоза (Nel et al., 2006).

Более существенное искажение МРТ-сигнала, наблюдаемое на 40-е сут у крыс после многократного внутривенного введения НЧМ, объясняется большей в сравнении с однократным введением суммарной дозой магнетита (2 г/кг).

Разделение Перлс-позитивных клеток на три класса играет существенную роль в понимании процессов элиминации наноразмерных частиц клетками системы МНФ и отражает последовательность стадий накопления ими наноматериала. Благодаря способности к активному движению макрофаги могут эвакуироваться из организма, что определяет основной способ выведения наноразмерных частиц (Kostarelos et al., 2007).

В печени животных в ранние сроки после однократного и многократного внутривенных введений НЧМ наблюдаются функциональные изменения (общий и периваскулярный отек, полнокровие вен и микроциркуляторного русла, спазм артерий и др.) и органические (моноцеллюлярный некроз), которые начинают снижаться спустя 14 сут. Вероятно, к 14-м сут организм крыс элиминирует основное количество введенного наноматериала, а компенсаторно-приспособительные реакции достигают максимального развития. Тенденция к нормализации структуры печени к 40-м сут после однократного введения магнетита позволяет говорить о наличии у клеток печени механизмов элиминации и преобразования НЧМ. Стабилизация же повреждений печени к 14-м сут при многократном введении наноматериала свидетельствует о широких компенсаторных возможностях органа.

Нивелирование дисциркуляторных изменений в легком крыс к 40-м сут после однократного внутривенного

введения суспензии НЧМ объясняется выведением наноразмерных частиц. Описанные выше изменения в легких снижают эффективность газообмена, что может спровоцировать системные гипоксические изменения в организме (Brown et al., 2002).

Изменения в печени и легком могут быть результатом как непосредственного, так и опосредованного действия наноразмерных частиц на клетки. К непосредственному действию относятся накопление частиц в цитоплазме, сорбция их на мемbrane, повреждение плазматической или цитоплазматических мембран, денатурирующее действие частиц на белки мембран и цитоплазмы (Knaapen et al., 2002; Hong et al., 2007). Опосредованным действием могут быть, например, нарушение микроциркуляции за счет эмболии сосудов микроциркуляторного русла агрегатами наноразмерных частиц, внутрисосудистая или внутриклеточная активация свободнорадикальных процессов, инициация освобождения клетками медиаторов, участвующих в элиминации наноматериала, и другие процессы, которые вызывают ишемическую, токсическую или рецепторопосредованную гибель клеток (Gilmour et al., 2004; Salata, 2004; Rosi, Mirkin, 2005).

Преобладание в 1-е сут в печени крыс Перлс-позитивных клеток 3-го класса объясняется вовлечением системы МНФ в процесс поглощения НЧМ в течение первых 24 ч. Последующее накопление НЧМ в цитоплазме клеток 3-го класса сопровождается появлением клеток 1-го и 2-го классов, что иллюстрирует динамику процесса поглощения НЧМ из сосудистого русла.

Скопление клеток Купфера 1-го класса в области портальных трактов обеспечивается их миграцией из синусоидных капилляров к желчевыводящим путям и, вероятно, необходимо для их выведения в просвет ЖКТ в составе желчи (Jani et al., 1994; Nishimori et al., 2009). Полученные данные свидетельствуют о том, что способностью к миграции обладают лишь клетки, накопившие достаточно большое количество магнетита (1-й и 2-й классы), которые, вероятно, не могут обеспечить его выведение другими механизмами. Незначительное количество клеток 3-го класса в районе триад свидетельствует об их низкой склонности к миграции. Выявление магнетита этими клетками, вероятно, обеспечивается либо метаболизированием наночастиц, либо дополнительным его накоплением и преобразованием в клетки 1-го и 2-го классов, способных к выходу в желчные пути.

Снижение количества клеток Купфера 3-го класса в поздние сроки эксперимента свидетельствует о завершении процессов секвестрации свободных наночастиц и об отсутствии вовлечения в процесс поглощения НЧМ нативных клеток Купфера. Основные процессы поглощения завершены, и дальнейшие изменения в структуре клеток Купфера происходят только за счет их перехода из одного класса в другой (в ходе накопления наноматериала в цитоплазме) или метаболизирования частиц в клетках с низким содержанием магнетита (3-й класс).

В ранние сроки в легком крыс как после однократного, так и после многократного введения суспензии НЧМ Перлс-позитивные клетки располагаются в межальвеолярных перегородках перикапиллярно, что отражает начальные этапы поглощения ими НЧМ из сосудов микроциркуляторного русла. К 7-м сут в легких животных Перлс-позитивные альвеолярные макрофаги начинают кумулироваться перибронхиально и периальвеолярно, что свидетельствует о начале активного выхода клеток в

просвет бронхиального дерева (Peters et al., 1997; Kreyling et al., 2002). Эти наблюдения свидетельствуют о том, что легкое начинает элиминировать НЧМ уже в ранние сроки после введения. Клетки 3 класса к 40-м сут практически не встречаются, что можно объяснить завершающимся процессом элиминации введенной дозы НЧМ. Клетки 3-го класса редко встречаются в просвете альвеол, следовательно, для них миграция в просвет бронхолегочного дерева нехарактерна. По-видимому, эти клетки обеспечивают выведение НЧМ другими механизмами (например, преобразование кристаллической формы магнетита в ионную в лизосомах (Nel et al., 2006) либо дальнейшее поглощение и накопление магнетита в цитоплазме с преобразованием в клетки 2-го или 1-го классов, которые способны покинуть легкое путем миграции в просвет альвеол). К 40-м сут после однократного внутривенного введения суспензии НЧМ в легком крыс количество Перлс-позитивных макрофагов незначительно (Lee et al., 1985; Rehn et al., 2003).

Перлс-позитивные макрофаги в легком в ранние сроки (1 и 7 сут) располагаются главным образом периваскулярно, а на заключительных этапах — перибронхиально. Подобное изменение локализации клеток позволяет проиллюстрировать механизм удаления наноматериала из организма крысы путем миграции этих клеток в просвет бронхиального дерева и выведения из организма в составе бронхиальной слизи, что подтверждается наличием Перлс-позитивных макрофагов в просвете альвеол и бронхов.

Общее количество Перлс-позитивных макрофагов в печени и легком снижается к 40-м сут, что иллюстрирует активное участие системы МНФ в процессах выведения НЧМ.

Большее число Перлс-позитивных макрофагов в печени и легком крысы при многократном введении магнетита по сравнению с аналогичными сроками для крыс, получивших однократную внутривенную инъекцию наночастиц, объясняется большей суммарной дозой введенного магнетита и более полным вовлечением клеток системы МНФ в процесс поглощения наноматериала за счет привлечения клеток-предшественников макрофагов из кровеносного русла. Так, вероятно, многократное введение магнетита на протяжении 40 сут вызывает активацию моноцитопозза в красном костном мозге крыс за счет стимуляции синтеза и выделения гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (Boland et al., 2000).

Сохранение положительной реакции Перлса в печени и легком крыс в течение 40 сут после однократного внутривенного введения магнетита свидетельствует о склонности магнетита к накоплению. Сроки эксперимента не позволяют установить время, в течение которого происходит полное выведение НЧМ из организма животного.

Отсутствие Перлс-положительного окрашивания клеток паренхимы исследованных органов можно объяснить низким содержанием и высокой дисперсностью наноматериала, а также, возможно, недостаточной чувствительностью гистохимического метода Перлса.

Итак, внутривенное введение НЧМ сопровождается накоплением магнетита в клетках системы МНФ печени, легкого и селезенки крыс. Клетки системы МНФ играют основную роль в элиминации НЧМ. Количество Перлс-позитивных клеток в печени и легком после многократного внутривенного введения превосходит их численность в изученных органах после однократного введе-

ния. Спустя 40 сут после введения количество НЧМ в печени и легком снижается, однако полного выведения НЧМ после однократного внутривенного введения суспензии магнетита не происходит.

Список литературы

- Найден Е. П., Журавлев В. А., Итин В. И. 2006. Структура и магнитные свойства наноразмерных порошков простых ферритов, полученных методом механохимического синтеза. Изв. ВУЗов. Физика. 9 : 40—44.
- Саркисов В. М. 2002. Гистологическая техника. М.: Прогресс. 369 с.
- Boland S., Bonvallet V., Fournier T., Baeza-Squiban A., Aubier M., Marano F. 2000. Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 278 : L25—L32.
- Bonnemain B. 1998. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications — a review. J. Drug Target. 6 : 167—174.
- Brown J. S., Zeman K. L., Bennett W. D. 2002. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. Amer. J. Respir. Crit. Care. Med. 166 : 1240—1247.
- Gilmour P., Jimenez L. A., Stone V. 2004. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. Amer. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 286 : L344—L353.
- Hong J., Gong P., Xu D., Dong L., Yao S. 2007. Stabilization of chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel. J. Biotechnol. 128 : 597—605.
- Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T. 2005. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. J. Biosci. Bioeng. 100 : 1—11.
- Jani P. U., MacCarthy D. E., Florence A. T. 1994. Titanium dioxide (rutile) particles uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. Int. J. Pharm. 105 : 157—168.
- Knaapen A., Shi T., Borm P. J., Schins R. P. 2002. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. Mol. Cell. Biochem. 234 : 317—326.
- Kostarelos K., Lacerda L., Pastorin G., Wu W., Wieckowski S., Luangsivilay J., Godefroy S., Pantarotto D., Briand J.-P., Muller S., Prato M. and Bianco A. 2007. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. Nature: Nanotechnology. 2 : 108—113.
- Kreyling W. G., Semmler M., Erbe F., Mayer P., Takenaka S., Schulz H. 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. J. Toxicol. Environ. Health. 65 : 1513—1530.
- Krotz F., de Wit C., Sohn H. Y., Zahler S., Gloe T., Pohl U., Plank C. 2003. Magnetofection—a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery *in vitro* and *in vivo*. Mol. Therapy. 7 : 700—710.
- Lee K. P., Trochimowicz H. J., Reinhardt C. F. 1985. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO_2) by inhalation for two years. Toxicol. Appl. Pharmacol. 79 : 179—192.
- Lubbe A. S., Bergemann C., Brock J., McClure D. G. 1999. Physiological aspects in magnetic drug-targeting. J. Magnetism and Magnetic Materials. 194 : 149—155.
- Martina M. S., Fortin J.-P., Menager C., Clement O., Barratt G., Grabielle-Madelpont C., Gazeau F., Cabuil F., Lesieur F. 2005. Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for *in vivo* imaging. J. Amer. Chem. Soc. 127 : 10 676—10 685.
- Nel A., Xia T., Madler L., Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science. 311 : 622—627.
- Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. 2009. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. Eur. J. Pharmacol. Biopharm. 72 : 496—501.

- Pankhurst Q. A., Connolly J., Jones S. K., Dobson J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 : 167—181.
- Panyam J., Zhou W. Z., Prabha S., Sahoo S. K., Labhasetwar V. 2002. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J.* 16 : 1217—1226.
- Peters A., Wichmann H. E., Tuch T., Heinrich J., Heyder J. 1997. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Amer. J. Respir. Crit. Care. Med.* 155 : 1376—1383.
- Rehn B., Seiler F., Rehn S., Bruch J., Maier M. 2003. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189 : 84—95.
- Rosi N. L., Mirkin C. A. 2005. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem. Review.* 105 : 1547—1562.
- Salata O. V. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnol.* 2 : 120—127.
- Thibodeau M. S., Giardina C., Knecht D. A., Knecht D. A., Helble J., Hubbard A. K. 2004. Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. *Toxicol. Sci.* 80 : 34—48.
- Weissleder R., Elizondo G., Wittenberg J. 1990. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology.* 175 : 494—498.
- Zhang Y., Kohler N., Zhang M. 2002. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials.* 23 : 1553—1561.

Поступила 9 III 2011

CELLS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES SYSTEM OF LIVER AND LUNG IN RATS AFTER INTRAVENOUS APPLICATION OF MAGNETITE NANOPARTICLES

I. V. Milto,¹ I. V. Suhodolo,¹ V. Yu. Usov²

¹ Siberian State Medical University and

² Scientific Research Institute of Cardiology of Siberian Branch of RAMS, Tomsk;
e-mail: milto_bio@mail.ru

The article describes changes in the morphology and localization of the cells of mononuclear phagocyte system of liver and lung in rats at different times after single and repeated intravenous administration of a suspension of nanoparticles of magnetite (NPM). Mechanisms for removal of nanoparticles of magnetite from the rat body with the participation of mononuclear phagocytes of the liver (removal of the particles by stellate macrophages in the gastroenteric tract with bile) and of the lung (by migration of the alveolar macrophages in the gleam of the bronchial tree) have been illustrated. It has been shown that intravenous application of nanomagnetite causes changes in the morphology of the internal organs of rats and the severity of these changes increases with increasing total dose injected magnetite.

Key words: nanoparticles of magnetite, stellate (Kupfer's cell) and alveolar macrophages.