

На правах рукописи

Павел

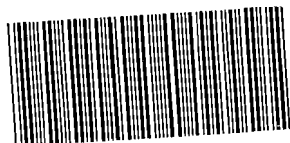
ПАХОМИЙ Светлана Сергеевна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ
ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ**

14.03.02 – патологическая анатомия

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук

7 НОЯ 2013



005536910

Саратов -2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Маслякова Галина Никифоровна.

Официальные оппоненты:

Доросевич Александр Евдокимович, доктор медицинских наук, профессор; ГБОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия Минздрава России; кафедра патологической анатомии, заведующий кафедрой;

Бугоркова Светлана Александровна, доктор медицинских наук; ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»; лаборатория патоморфологии отдела иммунологии; заведующая лабораторией.

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 24.10 2013 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 208.094.01 при ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Б.Казачья, 112.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России.

Автореферат разослан « 25.10 » 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Маслякова Г.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В последнее время все больше исследований в области нанотехнологий направлены на решение задач практической медицины. Предполагается, что в ближайшем будущем использование наноматериалов приведет к революционным достижениям в лечении многих заболеваний. Уже сегодня коллоидное золото применяют в качестве носителя для доставки лекарственных веществ, генетического материала, антигенов и как собственно лекарственное или диагностическое средство при терапии опухолей или ревматоидного артрита (Khlebtsov N.G., Dykman L.A., 2011).

Однако практически одновременно с началом медицинских применений наноматериалов возникли острые вопросы по поводу их возможного токсического воздействия на клетки и ткани живых организмов. Несмотря на то, что наноматериалы в мире уже используются более 10 лет, ни один вид наночастиц не был изучен в полном объеме на безопасность ни в одной из стран мира (Онищенко Г.Г., 2007). Анализ современных данных показывает, что, с одной стороны, на базе научных разработок появляются новые «прорывные» технологии и материалы, с другой стороны, активное развитие нанотехнологий может привести к появлению нового класса соединений, оказывающих токсическое влияние на организм человека и животных.

Учитывая, что в перспективе ожидается тесный контакт человека и других биологических объектов с наноматериалами, изучение вопросов потенциальных рисков их использования представляется первостепенной задачей (Онищенко Г.Г., 2007). Именно поэтому в специальной литературе последних 4-5 лет особое внимание уделяется вопросам биораспределения и токсичности наноматериалов. В частности, безопасное применение золотых наночастиц (ЗНЧ) невозможно без решения вопросов их потенциальной токсичности с учетом размеров, длительности и способов введения. Особое значение в этом аспекте имеет определение характера и выраженности повреждающего влияния ЗНЧ на организм лабораторных животных с

обязательным морфологическим исследованием внутренних органов. Это обусловлено тем, что оценка морфологического состояния органов, в первую очередь ответственных за метаболизм и экскрецию, непосредственно после окончания введения исследуемого вещества позволяет визуально оценить патологические изменения в структуре органа и охарактеризовать их количественно (Хабриев Р.У., 2005). Кроме того, изучение морфологического строения внутренних органов через определенный период времени после окончания введения вещества с исследованием тех же показателей дает возможность судить об обратимости выявленной патологии.

До настоящего времени анализ морфологических изменений и их обратимости во внутренних органах лабораторных животных, возникающих в ответ на увеличение длительности перорального введения ЗНЧ разного размера, не проводился. Перечисленные и нерешенные задачи, связанные с оценкой воздействия размерных эффектов ЗНЧ на организм лабораторных животных, определили актуальность и целесообразность выполнения настоящего исследования.

Цель исследования

Оценить выраженность и обратимость морфологических изменений в органах лабораторных животных при длительном пероральном введении золотых наночастиц разного размера.

Задачи исследования

1. Изучить влияние размера перорально вводимых золотых наночастиц на морфологическое строение органов лабораторных животных.
2. Провести сравнительный анализ морфологических изменений в органах лабораторных животных при различных сроках введения ЗНЧ размером 1-3, 15 и 50 нм и выявить органы-мишени, характерные для поражения золотыми наночастицами определенного размера.
3. Изучить обратимость морфологических изменений в органах лабораторных животных после окончания перорального введения золотых наночастиц разного размера.

4. Сопоставить скорость восстановления морфологических изменений в органах с длительностью перорального введения золотых наночастиц разных размеров.

Научная новизна

Впервые в экспериментах *in vivo* исследованы особенности влияния длительного перорального введения ЗНЧ разного размера на организм лабораторных животных. Описаны морфологические изменения во внутренних органах, возникающие в результате перорального введения ЗНЧ размерами 1-3, 15 и 50 нм в течение 8, 16 и 30 дней. Проведен сравнительный анализ морфологических изменений во внутренних органах при различных сроках введения ЗНЧ и установлены органы-мишени, характерные для поражения ЗНЧ определенного размера. Установлена зависимость обратимости патологических процессов во внутренних органах от длительности перорального введения ЗНЧ различных размеров. Предложен методологический подход к оценке морфологических изменений в органах лабораторных животных, основанный на количественной оценке дистрофических, некробиотических и репаративных процессов в ответ на введение золотых наночастиц различного размера.

Практическая значимость

Результаты выполненного исследования дополняют современные представления о характере и динамике развития морфологических изменений во внутренних органах лабораторных животных в ответ на введение ЗНЧ. Данные, полученные при изучении влияния длительности введения ЗНЧ различных размеров на морфологическое строение внутренних органов, могут быть использованы в работе лабораторий научно-исследовательских институтов и учебных заведений, а также при разработке стандартов безопасного применения коллоидного золота в практической медицине.

Разработанный методологический подход к оценке альтеративно-пролиферативных процессов, развивающихся во внутренних органах в ответ на введение ЗНЧ, основанный на количественных показателях, позволяет выявить степень их токсического воздействия и обратимости развивающихся патологических процессов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Длительное пероральное введение золотых наночастиц размерами 1-3, 15 и 50 нм вызывает морфологические изменения в органах лабораторных животных, характер и выраженность которых обусловлены размером золотых наночастиц и длительностью их введения.
2. Патологические процессы, развивающиеся в органах, носят обратимый характер.
3. Предложенный методологический подход, основанный на определении количественных показателей повреждения и пролиферации, позволяет оценить степень токсичности ЗНЧ и обратимость развивающихся патологических процессов в органах.

Внедрение результатов работы в практику

Полученные научные данные используются в учебном процессе на кафедрах патологической анатомии, гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, в научно-исследовательской работе НОЦ «Фундаментальной медицины и нанотехнологий» НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России.

Апробация работы

Основные материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на III Международном форуме по нанотехнологиям (Москва, 2010); III эмбриологическом симпозиуме Всероссийского научно-медицинского общества анатомов, гистологов, эмбриологов «ЮГРА-ЭМБРИО-2011» (Ханты-Мансийск, 2011); международных конференциях Saratov Fall Meeting – 2011 (Saratov, 2011); European Network of Excellence for Biophotonics – 2011 (Saratov, 2011); Saratov Local Cluster Meeting 2011 (Saratov, 2011); Saratov Fall Meeting 2012-Annual School for Young Scientists and Students of Optics, Laser Physics and Biophotonics (Saratov, 2012); заседании Саратовского областного общества патологоанатомов (Саратов, 2013).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 5 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов работы, главы собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 47 рисунками. Библиография содержит 176 источников (36 отечественных и 140 зарубежных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на кафедре патологической анатомии и базе научно-образовательного центра «Фундаментальной медицины и нанотехнологий» ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России. Эксперимент выполнен на 240 здоровых белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 180-220 г.

Принимая во внимание тот факт, что одним из главных параметров токсичности является размер наночастиц, в нашем исследовании использовались частицы коллоидного золота диаметром 1-3 нм, 15 нм и 50 нм с числовой концентрацией $1,3 \cdot 10^{12}$ шт./мл и $3,5 \cdot 10^{10}$ шт./мл, соответственно (концентрация золота 57 мкг/мл), синтезированные в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН г. Саратов (зав. лабораторией докт. физ.-мат. наук Хлебцов Н.Г.). Для увеличения биодоступности и биосовместимости наночастицы были конъюгированы с полиэтиленгликолем PEG-SH (Nektar, USA).

Модель экспериментального исследования разрабатывалась в соответствии с положениями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Хабриев Р.У., 2005). Учитывая возможность длительного перорального применения ЗНЧ и препаратов на их основе, эксперимент был разделен на 2 серии. Первая серия

включала в себя изучение морфологических изменений в органах лабораторных животных при пероральном введении золотых наночастиц размерами 1-3, 15 и 50 нм длительностью 8, 16 и 30 суток. Вторая серия была посвящена анализу обратимости выявленных изменений в органах лабораторных животных при длительном пероральном введении ЗНЧ. Забор необходимого материала проводили через 14 дней после окончания введения золотых наночастиц размерами 1-3, 15 и 50 нм в течение 8, 16 и 30 дней. К каждой опытной группе животных были сформированы контрольные группы, животным которых вводился физиологический раствор в объеме 1 мл в течение 8, 16 и 30 дней.

Для морфологического исследования образцы внутренних органов фиксировали в 10%-ом растворе формалина, подвергали стандартной спиртовой и ацетоновой проводке, заливали в парафин. После депарафинизации срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином для обзорного гистологического изучения. Для дифференциальной диагностики гемосидерина и конгломератов ЗНЧ использовалась реакция по Перлсу. Для выявления конгломератов золотых наночастиц в исследуемых органах применяли метод микроскопии темного поля с использованием микроскопа Leica DM 2500 со специальной приставкой, позволяющей осуществлять боковое освещение при 400-кратном увеличении.

Для изучения пролиферативной активности гепатоцитов проводили иммуногистохимическое исследование с использованием кроличьих поликлональных антител (Anti-Ki-67, Abcam, United Kingdom). Использовали одноэтапный протокол с трипсинизацией – демаскировкой антигена по стандартной схеме проведения иммуногистохимического исследования (Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2004). Клетки, давшие положительную иммуногистохимическую реакцию, окрашивались в коричневый цвет. Результат реакции оценивали по системе подсчета Histochemical score. Система подсчета включает в себя оценку интенсивности иммуногистохимической окраски по 3-балльной шкале и долю (%) окрашенных клеток, и представляет собой сумму произведений процентов окрашенных клеток на балл

интенсивности окраски. Интенсивность окраски: 0 – нет окрашивания; 1 – слабое окрашивание; 2–умеренное окрашивание; 3 – сильное окрашивание.

Формула подсчета следующая: $\text{Histochemical score} = \sum P(i) \times i$

где i – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0-3

$P(i)$ – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

Морфометрический анализ гистологических препаратов проводили с использованием системы анализа цифровых изображений Микровизора медицинского $\mu\text{Vizo-101}$ ЛОМО. Применяли также стандартный метод подсчета клеточных элементов при увеличении 200, 400 с использованием специализированной морфометрической сетки (Автандилов Г.Г., 1972, 1992).

Для обработки полученных в ходе исследований данных был использован пакет прикладных статистических программ «STATISTICA 10.0» (Stat Soft Inc., США). Предварительная статистическая обработка данных заключалась в проверке соответствия формы распределения количественных признаков нормальному, для чего применяли тест Колмогорова-Смирнова, а также определяли равенство генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера. Нулевую гипотезу отвергали в случае $p < 0,05$. Для каждого показателя в исследуемых группах вычисляли среднее арифметическое (M), среднюю ошибку среднего арифметического (m). Оценку различий между выборками проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Исследование корреляционных взаимосвязей между количественными признаками осуществляли при помощи метода Пирсона, при этом определяли наличие связи, ее направление и силу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов морфологического исследования органов лабораторных животных позволил выявить ряд закономерностей в развитии повреждающего действия ЗНЧ. Так, выраженность и обратимость морфологических изменений в печени, почках, селезенке и легких зависели от размера ЗНЧ и длительности их введения, в то время как морфологические

изменения в желудке, сердце и головном мозге не имели ни размерной, ни временной зависимости.

В печени нами были обнаружены наиболее выраженные морфологические изменения, что, вероятно, связано с дезинтоксикационной функцией органа. Во всех группах введения ЗНЧ в течение 8, 16 и 30 дней развивающиеся патологические процессы имели однотипный характер и были представлены в виде нарушения кровенаполнения органа (отека и полнокровия), а также различной степени выраженности дистрофических и некротических процессов в гепатоцитах, увеличения количества непаренхиматозных элементов (НПЭ) печени (табл. 1; 2; 3). Следует отметить, что с увеличением длительности эксперимента морфологические изменения в органе приобретали более выраженный характер.

В группах 8-дневного введения ЗНЧ наиболее выраженные морфологические изменения обнаружены при введении ЗНЧ размерами 1-3 нм и 50 нм: в большинстве гепатоцитов развивалась зернистая дистрофия, встречались единичные клетки с вакуольной дистрофией, появлялись умеренно выраженные некробиотические изменения и фокальные некрозы гепатоцитов. Дистрофические изменения в группе введения ЗНЧ размером 15 нм носили незначительный характер.

Для подтверждения размерно-зависимого влияния ЗНЧ на морфологию печени мы провели морфометрическое исследование с использованием таких показателей, как коэффициент нормализации паренхимы (КНП), количество лимфоцитов и непаренхиматозных элементов (НПЭ), двуядерных гепатоцитов.

КНП является одним из важнейших критериев в морфологической оценке состояния печени, поскольку он позволяет оценить интенсивность дистрофических и некробиотических изменений в печени на основе отношения количества нормальных гепатоцитов к дистрофически и некротически измененным (Солопаева И.М., 1969, 1990).

Таблица 1
Изменения гистологического строения печени с учетом длительности введения ЗНЧ размером 1-3 мкм

Исследуемые показатели	Контрольная группа	Длительность введения ЗНЧ размером 1-3 мкм					
		8 дней введения		16 дней введения		30 дней введения	
		В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней
Степень выраженности дистрофии гепатоцитов	--	+ / ++	+	++ / +++	+	+++	+
Наличие фрагментации цитоплазмы гепатоцитов	--	--	--	++	--	+++	--
Степень полнокровия	+ / ++	++ / +++	+ / ++	+	++ / +++	+	+++
Феномен сепарации крови	--	+ / --	+ / --	+ / --	+	+ / --	+
Кол-во дистрофически измененных гепатоцитов	37,2±4,08	124,58±9,7*	41±3,9	158,8±10,6*	48,3±3,5*	166,8±11,9*	59±8,9*
Кол-во неизмененных гепатоцитов	431,5±24,9	143,7±11,9*	383,9±11,7*	67,5±6,87*	377,5±11,3*	33,8±9,4*	364,7±14,3*
Кол-во некрозов	--	43,9±6,0	15,5±2,64	54,2±9,18*	22,5±1,18	79,7±8,08*	28,5±3,8
КНП	11,7±1,7	1,15±0,1*	9,3±0,7*	0,41±0,05*	7,8±0,6*	0,2±0,06*	6,1±0,5*
Абсолютное число НПЭ	26,2±5,9	47,5±3,67*	60±8,9*	38,1±3,21*	67,8±8,6*	55,3±7,21*	77,6±12,3*
Кол-во лимфоцитов	17,6±4,24	38,2±3,04*	50,5±8,49*	25,8±5,98*	48,5±3,7*	32,5±7,6	52,16±6,4*
Кол-во клеток стромы	8,5±2,29	9,33±1,49	10,2±2,8	14,7±1,85*	20,2±3,45*	22,6±4,6	27,8±6,46*
Кол-во двуядерных гепатоцитов	5,6±1,5	7±1,41	16,16±3,8*	8±1,87	17,7±1,48*	5,08±1,24	16,8±3,3*

Примечание: * - достоверность различий с группой контроля (P<0,001).

Таблица 2
Изменения гистологического строения печени с учетом длительности введения ЗНЧ размером 15 нм

Исследуемые показатели	Контроль- ная группа	Длительность введения ЗНЧ размером 15 нм					
		8 дней введения		16 дней введения		30 дней введения	
		В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней
Степень выраженности дистрофии гепатоцитов	--	+	+/-	++	+	++	+
Наличие фрагментации цитоплазмы гепатоцитов	--	--	--	+/-	--	+	--
Степень полнокровия	+/++	+/++	+/++	+	++	++	+/+++
Феномен сепарации крови	--	--	+/-	--	--	--	+
Кол-во дистрофически измененных гепатоцитов	37,2±4,08	82,7±6,18*	36,6±9,21	108,5±11,6*	44,3±6,4*	148,8±10,5*	51,8±5,6*
Кол-во неизмененных гепатоцитов	431,5±24,9	243±21,2*	393,8±17,4*	151,4±10,3*	383,3±8,3*	122±33,13*	375,7±10,8*
Кол-во некрозов	--	26,3±3,16	13±3,9	40,6±3,7*	20,6±4,2	59,7±8,9*	26,5±4,9
КНП	11,7±1,7	2,9±0,23*	10,6±1,7	1,4±0,18*	8,6±0,78*	0,82±0,43*	7,65±0,7*
Абсолютное число НПЭ	26,2±5,9	51,4±11,04*	44,3±4,9*	50±4,17*	52,7±6,7*	59,4±14,16*	44,6±9,5*
Кол-во лимфоцитов	17,6±4,24	38,3±9,12*	33,7±3,6*	29,6±1,9*	40,5±8*	36,3±11,8*	30,6±6,65*
Кол-во клеток стромы	8,5±2,29	13,4±2,55*	10,5±2,29	19,3±3,7*	11,2±2,16*	23,1±3,9*	15,1±5,57*
Кол-во двуядерных гепатоцитов	5,6±1,5	6,7±1,5	17,4±2,29*	7,2±1,24	17±2,7*	6,9±1,8	18,5±1,7*

Примечание: * - достоверность различий с группой контроля (P<0,001).

Таблица 3
Изменения гистологического строения печени с учетом длительности введения ЗНЧ размером 50 нм

Исследуемые показатели	Контроль- ная группа	Длительность введения ЗНЧ размером 50 нм					
		8 дней введения		16 дней введения		30 дней введения	
		В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней
Степень выраженности дистрофии гепатоцитов	--	++	+	++/+++	+	+++	+
Наличие фрагментации цитоплазмы гепатоцитов	--	+	--	+	--	+	--
Степень полнокровия	+/++	+/++	+++	+/++	+/+++	+/+++	+/+++
Феномен сепарации крови	--	--	+/-	--	--	--	+/-
Кол-во дистрофически измененных гепатоцитов	37,2±4,08	99,08±10,9*	42,3±6,7	170,5±8,43*	53,5±8,25*	205±15,1*	62,3±7,9*
Кол-во неизмененных гепатоцитов	431,5±24,9	122,8±9,8*	385,5±23,9*	53,9±9,62*	386,7±11,5*	20,6±6,34*	379,4±15,3*
Кол-во некрозов	--	31,6±6,38	23,7±4,6	45,5±7,9*	33,7±4,39	96,8±8,5*	51,2±5,9
КНП	11,7±1,7	1,2±0,126*	9,1±0,7*	0,31±0,07*	7,2±0,68*	0,09±0,03*	6,2±0,56*
Абсолютное число НПЭ	26,2±5,9	34±4,17*	68,5±9,79*	49,4±3,36*	61,8±9*	64,9±8,05*	42,3±8,8*
Кол-во лимфоцитов	17,6±4,24	23,9±4,46*	55,4±8,25*	38,8±2,9*	41±7,8*	39,6±5,14	27,6±6*
Кол-во клеток стромы	8,5±2,29	10±2	13,16±2,6*	11,4±1,16*	19,3±3,7*	26,9±4,12*	14,58±3,3*
Кол-во двуядерных гепатоцитов	5,6±1,5	8,4±2,15	18,4±2,57*	6,4±1,3	15,58±2,23*	6,41±1,8	15,5±2,46*

Примечание: * - достоверность различий с группой контроля (P<0,001).

В результате исследования мы установили, что во всех опытных группах 8-дневного введения ЗНЧ при сравнении с показателями контрольной группы отмечается значительное увеличение числа гепатоцитов в состоянии дистрофии и некроза, уменьшение количества неизмененных клеток и, как следствие, снижение КНП. Максимальное количество гепатоцитов в состоянии дистрофии и некроза нами обнаружено при введении ЗНЧ размером 1-3 нм ($124,58 \pm 9,7$; $P < 0,001$), минимальное – в группе введения ЗНЧ 15 нм ($82,7 \pm 6,18$; $p < 0,001$). Наиболее выраженное отклонение КНП от результатов в контрольной группе обнаружено в группах введения ЗНЧ размерами 1-3 нм и 50 нм ($1,15 \pm 0,12$ и $1,2 \pm 0,126$ соответственно, $P < 0,001$).

Во всех опытных группах наблюдалось статистически значимое увеличение абсолютного числа клеточных элементов как за счет лимфоцитов, так и за счет НПЭ (клетки Купфера, Ито), что дает возможность предположить наличие активирующего влияния ЗНЧ на макрофагальную систему печени. Незначительное увеличение числа двуядерных гепатоцитов свидетельствует об усилении регенераторных процессов.

При корреляционном анализе обращает на себя внимание большое количество достоверных отрицательных взаимосвязей между исследуемыми показателями и размером ЗНЧ. Важным моментом, установленным в ходе корреляционного анализа, является тот факт, что максимальное повреждающее действие на печень оказали ЗНЧ размером 1-3 нм.

Восстановление морфологической картины печени через 14 дней после окончания 8-дневного введения ЗНЧ наблюдалось во всех опытных группах. Полученные показатели свидетельствовали об уменьшении степени полнокровия и отека стромы, а также уменьшении объема самих гепатоцитов, в которых развивались дистрофические процессы, имеющие обратимый характер.

По данным морфометрического исследования практически все исследуемые морфологические показатели печени приближались к контрольным значениям. Следует отметить, что статистически достоверные различия КНП с показателями в контрольной группе найдены только в группах введения ЗНЧ размером 1-3 нм и 50 нм. В этих же группах отмечалось увеличение абсолютного числа НПЭ

преимущественно за счет повышения количества лимфоцитов. Противоположная динамика данных клеточных элементов наблюдалась в группе введения ЗНЧ размером 15 нм: отмечалось снижение абсолютного числа НПЭ вследствие уменьшения количества лимфоцитов и клеток стромы.

Количество двуядерных гепатоцитов после прекращения введения ЗНЧ значительно увеличилось во всех опытных группах, как по сравнению с показателями в группах 8-дневного введения, так и контрольной группы. В группе введения ЗНЧ 1-3 нм количество двуядерных гепатоцитов составило $17,4 \pm 2,29$; ЗНЧ 15 нм и 50 нм – $18,4 \pm 2,57$ и $16,16 \pm 3,8$ соответственно.

В группах 16-дневного введения ЗНЧ морфологические изменения в печени также были представлены дистрофическими и некротическими изменениями, а также нарушением кровообращения различной степени выраженности. В группах введения ЗНЧ увеличивалось количество гепатоцитов в состоянии дистрофии и некроза, особенно в группе введения ЗНЧ размерами 50 нм, что приводило к уменьшению КНП по сравнению с группой 8-дневного введения. Минимальные значения КНП были найдены в группах введения ЗНЧ 1-3 нм и 50 нм ($0,41 \pm 0,05$ и $0,31 \pm 0,07$ соответственно). Во всех опытных группах по сравнению с группой контроля отмечалось повышение абсолютного числа НПЭ как за счет увеличения количества лимфоцитов, так и за счет повышения числа клеток стромы, незначительное увеличение числа двуядерных гепатоцитов.

При изучении обратимости во всех опытных группах обращало на себя внимание уменьшение выраженности дистрофических изменений гепатоцитов. Следует отметить, что минимальное количество дистрофически измененных гепатоцитов и максимальное значение КНП были получены в группе введения ЗНЧ 15 нм. Абсолютное количество НПЭ печени в группах введения ЗНЧ 1-3 нм и 50 нм увеличивалось практически в два раза за счет повышения количества как лимфоцитов, так и клеток стромы. Количество двуядерных гепатоцитов значительно увеличилось во всех опытных группах: в группе введения ЗНЧ 1-3 нм – до $17,7 \pm 1,48$; ЗНЧ 15 нм и 50 нм – до $17 \pm 2,7$ и $15,58 \pm 2,23$ соответственно (при контрольных значениях $5,6 \pm 1,5$).

При 30-дневном введении ЗНЧ были обнаружены максимально выраженные морфологические изменения. В группах введения ЗНЧ 1-3 нм и 50 нм обращало на себя внимание отсутствие балочного строения, выраженная вакуольная дистрофия гепатоцитов. Следует отметить, что в группе введения ЗНЧ 15 нм балочное строение гепатоцитов было сохранено, отмечалась умеренная дистрофия гепатоцитов. При морфометрическом анализе во всех опытных группах отмечалось значительное уменьшение количества неизмененных гепатоцитов и КНП. Минимальное значение КНП ($0,09 \pm 0,03$) получено при введении ЗНЧ 50 нм. Количество НПЭ печени во всех опытных группах практически в два раза превышало контрольные значения. Увеличение наблюдалось как за счет повышения количества лимфоцитов, так и за счет увеличения числа клеток стромы. Количество двуядерных гепатоцитов увеличивалось незначительно.

При изучении обратимости в группах 30-дневного введения отмечалось частичное восстановление морфологической структуры органа. Уменьшалась выраженность дистрофии. По данным морфометрического анализа КНП на 14 день после окончания введения ЗНЧ увеличивался более чем в 6 раз во всех опытных группах, но оставался ниже по сравнению с контрольными данными. Изменения со стороны макрофагальной системы носили разнонаправленный характер: в группе введения ЗНЧ 1-3 нм отмечалось повышение абсолютного числа НПЭ до $77,6 \pm 12,3$; в группах введения ЗНЧ 15 нм и 50 нм – снижение до $44,6 \pm 9,5$ и $42,3 \pm 8,8$ соответственно. Количество двуядерных гепатоцитов увеличилось во всех группах более чем в три раза по сравнению с группой контроля.

Учитывая, что наиболее выраженные морфологические изменения нами были получены в группах 30-дневного введения ЗНЧ, мы провели ИГХ-исследование с маркером Ki-67 для оценки пролиферативной активности гепатоцитов в ответ на повреждающее воздействие ЗНЧ. При иммуногистохимическом исследовании печени реакция с маркером Ki-67 наблюдалась во всех группах введения ЗНЧ разных размеров. Среднее значение

гистосчета при 30-дневном введении ЗНЧ размером 1-3 нм составило $144,4 \pm 12,4$; ЗНЧ размером 15 нм – $141,5 \pm 10,3$; ЗНЧ размером 50 нм – $150,3 \pm 13,2$ (при контрольных значениях $4,14 \pm 1,04$; $P < 0,001$). Результаты ИГХ-исследования свидетельствуют о высокой пролиферативной активности гепатоцитов при 30-дневном введении ЗНЧ. При исследовании на 14 день после окончания 30-дневного введения среднее значение гистосчета уменьшалось: ЗНЧ размером 1-3 нм – до $102,3 \pm 8,2$; ЗНЧ размером 15 нм – до $98 \pm 7,4$; ЗНЧ размером 50 нм – до $123 \pm 11,5$.

Увеличение количества двуядерных гепатоцитов мы расценивали как проявление регенераторных процессов, способствующих восстановлению печёночной ткани за счёт увеличения количества функционирующих гепатоцитов. Мы согласны с мнением В.В. Садовниковой и др. (2001), что повышение количества двуядерных гепатоцитов свидетельствует об усилении белково-синтетической функции печени, что может расцениваться как единый компенсаторно-приспособительный механизм, направленный на нормализацию структуры и функции органа.

Следует отметить, что мы ни в одном случае не увидели скоплений ЗНЧ в печени, а обнаружили лишь косвенные признаки их присутствия в виде дистрофических и некротических изменений паренхимы и активации макрофагальной системы, хотя многие авторы считают печень первичным органом, аккумулирующим ЗНЧ (Джумагазиева Д.С. и соавт., 2011; DeJong W.H. и соавт., 2008).

В почках в группах 8-дневного введения ЗНЧ морфологические изменения были представлены преимущественно умеренным полнокровием сосудов коры, дистрофическими и некротическими изменениями эпителия извитых канальцев от незначительной до умеренной степени выраженности. При исследовании обратимости максимальное восстановление морфологической картины почек отмечалось в группе введения ЗНЧ 15 нм: сохранялось умеренное полнокровие, в нескольких полях зрения отмечались участки незначительной дистрофии эпителия.

В группах 16-дневного введения ЗНЧ наиболее выраженные отклонения в морфологическом строении почек найдены при введении ЗНЧ 1-3 нм и 50 нм: уменьшались размеры клубочков, с запустеванием капиллярных петель, развивалась умеренная и выраженная степени дистрофии эпителия извитых канальцев вплоть до некроза отдельных клеток.

При введении ЗНЧ в течение 30 дней наиболее выраженные морфологические изменения в почках обнаружены в группе введения ЗНЧ 50 нм. В данной группе обнаруживалось выраженное полнокровие капилляров клубочков, развивалась выраженная дистрофия и фрагментация цитоплазмы эпителия извитых канальцев, некроз эпителиоцитов. При изучении обратимости морфологических изменений в почках в группах введения ЗНЧ 1-3 нм и 15 нм уменьшалась степень выраженности дистрофии эпителия извитых канальцев, при введении ЗНЧ 50 нм – оставалась выраженной. Следует отметить, что при микроскопии методом темного поля скоплений ЗНЧ в почках не обнаружено.

В селезенке в группах 8-дневного введения ЗНЧ наиболее значимые морфологические изменения были обнаружены при введении ЗНЧ 50 нм: наряду с полнокровием красной пульпы, в белой обнаруживали увеличение размеров лимфатических фолликулов с появлением в них светлых центров размножения. При исследовании обратимости на 14 день после окончания 8-дневного введения ЗНЧ в большинстве случаев отмечалось нормальное кровенаполнение органа. В белой пульпе только в группе введения ЗНЧ 50 нм в единичных фолликулах сохранялись светлые центры размножения, представленные небольшим количеством бластных клеток.

При 16-дневном введении ЗНЧ во всех группах граница между красной и белой пульпой отчетливо не различалась, лимфатические фолликулы были значительно увеличены в размерах, содержали светлые центры размножения, представленные крупными бластными клетками, что свидетельствовало об активации пролиферации. В ранее опубликованных нами работах (Фирсова С.С. и соавт., 2011) подтверждением активизации пролиферативных процессов не только в селезенке, но и костном мозге было увеличение бластных форм.

При изучении обратимости на 14 день после окончания введения ЗНЧ размеры лимфатических фолликулов оставались увеличенными, отмечалось распространение лимфоцитов и макрофагов на красную пульпу. Большинство фолликулов имели хорошо различимые светлые центры размножения, содержащие бластные клетки.

При 30-дневном введении ЗНЧ размером 1-3 нм и 15 нм в красной пульпе отмечалось нормальное кровенаполнение органа, при ЗНЧ 50 нм – малокровие. Во всех группах граница между красной и белой пульпой отчетливо не различалась, лимфатические фолликулы были значительно увеличены в размерах, содержали светлые центры размножения, представленные крупными бластными клетками. При исследовании обратимости в группах введения ЗНЧ 1-3 нм и 15 нм отмечалось уменьшение размеров лимфоидных фолликулов, центры размножения были не выражены. В группе введения ЗНЧ 50 нм в большинстве случаев восстанавливалось нормальное кровенаполнение органа, размеры лимфатических фолликулов были увеличены, сохранялись светлые центры размножения, представленные крупными бластными клетками.

Во всех опытных группах введения ЗНЧ в красной пульпе отмечалось скопление гранул черного цвета. При реакции по Перлсу часть гранул окрашивалась в голубой цвет (гемосидерин), часть оставалась черными (ЗНЧ). При микроскопии методом темного поля препаратов, окрашенных по Перлсу, неокрашенные частицы светились красным цветом.

Полученные нами результаты согласуются с материалами о влиянии ЗНЧ на иммунную систему, представленными в работе Злобиной О.В. и др. (2011). По данным авторов, пероральное введение ЗНЧ вызывает морфологические перестройки в мезентериальных лимфатических узлах, которые свидетельствуют об активации процессов миграции, пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, что предполагает наличие иммуномодулирующего действия.

В легких в группах 8-дневного введения ЗНЧ морфологические изменения в респираторном отделе обнаружены только при введении ЗНЧ 50 нм: отмечались

участки утолщения межальвеолярных перегородок за счет незначительного отека и полнокровия. Клеточные инфильтраты, располагающиеся в области корней легких, были увеличены в размерах и состояли преимущественно из лимфоцитов, немногочисленных бластных клеток, макрофагов, плазматических клеток. Обращало на себя внимание увеличение средней площади клеточной инфильтрации в группах введения ЗНЧ размерами 1-3 нм и 50 нм – $1578,6 \pm 134,5$ мм² и $1623,3 \pm 124,46$ мм² соответственно. При исследовании обратимости морфологических изменений во всех группах отмечалось уменьшение средней площади клеточной инфильтрации, при этом в группе введения ЗНЧ 15 нм – до контрольных значений.

При 16-дневном введении ЗНЧ во всех группах в легких наряду с признаками нарушения кровообращения появлялась периваскулярная и перибронхиальная лимфоидная инфильтрация. Клеточные инфильтраты в области корней легких в группах введения ЗНЧ 1-3 нм и 50 нм были значительно увеличены в размерах ($5734,6 \pm 867,6$ мм² и $5236,2 \pm 724,5$ мм² соответственно), в их составе обнаружены бластные клетки с формированием светлых центров размножения. Через 14 дней после прекращения введения ЗНЧ во всех опытных группах отмечалось уменьшение средней площади клеточной инфильтрации. Минимальная скорость уменьшения клеточных инфильтратов была в группе введения ЗНЧ размером 50 нм.

При 30-дневном введении ЗНЧ в легких нарастали явления отека и полнокровия. Средняя площадь клеточной инфильтрации в области корней легких увеличивалась во всех опытных группах, максимальное значение для данного показателя было получено при введении ЗНЧ 50 нм ($8614,3 \pm 853,3$). Обращало на себя внимание появление в составе инфильтратов бластных клеток с формированием светлых центров размножения. При изучении обратимости во всех группах отмечали уменьшение средней площади клеточной инфильтрации в области корней легких. Следует отметить, что при изучении обратимости в группах 16- и 30- дневного введения ЗНЧ в межальвеолярных перегородках сохранялись макрофаги, содержащие гемосидерин и наночастицы.

В сердце морфологические перестройки во всех группах введения носили однотипный характер и были представлены умеренно-выраженными дистрофическими изменениями кардиомиоцитов. Конгломератов ЗНЧ в миокарде не обнаружено ни в одной из опытных групп. При изучении обратимости в некоторых полях зрения отмечалась лишь незначительная дистрофия кардиомиоцитов.

В желудке грубых нарушений структуры органа не выявлено. Обращало на себя внимание наличие инфильтрации слизистой оболочки эозинофилами и скопление в железистом эпителии конгломератов ЗНЧ, которые при микроскопии методом темного поля демонстрировали характерное свечение за счет интенсивного рассеяния света. При изучении обратимости морфологических изменений на 14 день после окончания введения ЗНЧ во всех опытных группах слизистая оболочка желудка имела нормальное строение, скопления эозинофилов и конгломератов ЗНЧ нами не обнаружено.

В головном мозге морфологические изменения были представлены дистрофией нервных клеток, умеренным полнокровием сосудов мягкой мозговой оболочки, умеренным перипеллюлярным и периваскулярным отеком. Скоплений ЗНЧ в гистологических срезах головного мозга не найдено. При гистологическом исследовании через 14 дней после окончания введения ЗНЧ во всех исследуемых группах отмечалось нормальное кровенаполнение, сохранялись явления умеренно выраженного перипеллюлярного отека.

Полученные нами данные о морфологических изменениях в органах лабораторных животных согласуются с результатами работы Л.В. Сулеймановой и соавт. (2009), в которых морфологические изменения во внутренних органах при внутривенном введении ЗНЧ также носили размерно-зависимый характер.

ВЫВОДЫ

1. В печени, легких, почках и селезенке при введении ЗНЧ развиваются морфологические изменения, степень выраженности которых зависит от размера ЗНЧ и длительности их введения. Наиболее выраженные морфологические изменения вызывают золотые наночастицы размерами

- 1-3 нм и 50 нм. Морфологические изменения в желудке, сердце и головном мозге не имеют ни размерной, ни временной зависимости.
2. Введение ЗНЧ приводит к развитию во всех органах венозного полнокровия и отека разной степени выраженности; дистрофических и некробиотических процессов в печени и почках; активации процессов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток в печени, легких и селезенке. Установлено, что ЗНЧ размером 50 нм вызывают наиболее выраженные дистрофические и некробиотические процессы, а ЗНЧ размером 1-3 нм – пролиферативные.
 3. Развивающиеся патологические процессы имеют обратимый характер, о чем свидетельствует постепенное восстановление структуры органов через 14 дней после окончания введения ЗНЧ.
 4. Интенсивность восстановительных процессов в печени, легких, почках и селезенке зависит от размера золотых наночастиц и длительности их введения: максимальное восстановление структуры органов наблюдается после окончания введения золотых наночастиц размером 15 нм в течение 8 дней. Максимально выраженные патологические процессы сохраняются в органах через 14 дней после прекращения 30-дневного введения ЗНЧ размером 1-3 и 50 нм.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В работе лабораторий научно-исследовательских институтов и учебных заведений, а также при разработке стандартов безопасного применения коллоидного золота в практической медицине следует учитывать, что:

1. Наименьшее повреждающее воздействие на внутренние органы животных оказывают ЗНЧ размером 15 нм.
2. Наибольший токсический эффект, выражающийся в развитии дистрофических и некротических процессов, вызывают наночастицы размером 50 нм при длительности введения 30 дней.
3. ЗНЧ размером 1-3 нм вызывают в организме лабораторных животных активизацию иммунной системы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Морфологические изменения органов кроветворения и состояние периферической крови при длительном воздействии наночастиц золота /С.С. Фирсова, О.В. Злобина, А.Б. Бучарская, Б.Н. Хлебцов // Материалы третьего Международного форума по нанотехнологиям 2010. - www.rusnanoforum.ru.
2. Исследование мутагенной активности и морфофункциональных изменений при пероральном введении наночастиц золота / Н.А. Наволокин, С.М. Кун, С.С. Фирсова и др. // Молодые учёные – здравоохранению: Материалы 71-й межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых учёных с международным участием, посвящённой 65-летию со дня Победы в Великой Отечественной войне. - Саратов, 2010. - С.14.
3. Изменение морфологических показателей костного мозга и периферической крови при длительном воздействии золотых наночастиц/ С.С. Фирсова, А.Б. Бучарская, Г.Н. Маслякова, О.В. Злобина // Известия СГУ. Новая серия. Сер.: Физика. - 2011. –Том 11. - №2. - С. 54-57.
4. Сравнительная характеристика морфологических изменений в органах лабораторных животных при разных методах введения наночастиц золота / Н.А. Наволокин, Л.В. Сулейманова, С.С. Фирсова и др.//Вестник российского государственного медицинского университета: Материалы VI Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. - М.,2011. - С.224.(специальный выпуск № 1)
5. Морфологические изменения в мазке костного мозга при воздействии наночастиц золота/ С.С. Фирсова, О.В. Злобина, А.Б. Бучарская, Б.Н. Хлебцов// Молодые ученые – здравоохранению: Материалы 72-й межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. - Саратов, 2011. - С.293.
6. Изменения показателей периферической крови при длительном воздействии наночастиц золота / С.С. Фирсова, О.В. Злобина, А.Б. Бучарская, И.А. Дорошенко // Молодые ученые – здравоохранению: Материалы 72-й межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. - Саратов, 2011. - С.293 - 294.
7. Исследование мутагенного действия золотых наночастиц в микроядерном тесте / Д.С. Джумагазиева, Г.Н. Маслякова, Л.В. Сулейманова, С.С. Фирсова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Том 151.-№6. - С. 677-680.

8. **Морфофункциональное состояние белой пульпы селезенки при пероральном введении наночастиц золота в эксперименте / О.В. Злобина, С.С. Фирсова, А.Б. Бучарская и др. // Морфология. - 2011. -Том 140. - №5. - С. 88.**
9. **Morphokinetics of mesenterial lymphatic node cell populations at exposure of gold nanoparticles in experiment / O.V. Zlobina, I.O. Bugaeva, G.N. Maslyakova, S.S. Firsova // Russian Open Medical Journal. 2012. - Vol. 1. - Issue 3. - P. 0302.**
10. **Рассказова В.Ю., Злобина О.В., Пахомий С.С. Морфофункциональное состояние тимуса под влиянием золотых наночастиц в эксперименте // Бюллетень медицинских Интернет-конференций, 2013. - Vol.3. -Issue 5. - P. 928-930**
11. **Анализ накопления и биораспределения золотых наночастиц в мезентериальных лимфатических узлах при пероральном введении / О.В. Злобина, С.С. Пахомий, А.Б. Бучарская и др. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2013. -Том 9. - №1. - С. 17-20.**
12. **Морфологические изменения в органах лабораторных животных при длительном пероральном введении золотых наночастиц / Г.Н. Маслякова, С.С. Пахомий, А.Б. Бучарская // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2013. - Том 9. - №2. - С.208-213.**
13. **Accumulation and biodistribution of gold nanoparticles in the mesenteric lymph at oral administration / O.V. Zlobina, S.S. Pakhomiy, A.B. Bucharskaya et al.// Russian Open Medical Journal. - 2013. - Vol.2 - Issue 3. - P. 0301.**

Примечание:

Фамилия соискателя Фирсовой С.С. 30.04.2011 г. была изменена на Пахомий С.С.

Подписано в печать 10.10.2013 г. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Times New Roman. Печать RISO. Объем 1,0 печ.л. Тираж 100 экз. Заказ №199.

Отпечатано с готового оригинал-макета
Центр полиграфических и копиравальных услуг
Предприниматель Серман Ю.Б. Свидетельство № 3117
410600, Саратов, ул. Московская, д.152, офис 19, тел. 26-18-19, 51-16-28