УДК 59.08:616–091.8 Оригинальная статья

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПРОЛОНГИРОВАННОМ ВВЕДЕНИИ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

С. С. Пахомий — *ГБОУ ВПО ««Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского»» Минздрава России, ассистент кафедры патологической анатомии;* ***А.Б. Бучарская —*** *ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, руководитель Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии, кандидат биологических наук;* ***Н.А. Наволокин —*** *ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, аспирант кафедры патологической анатомии, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии;* ***Г.Н. Маслякова —*** *ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, заведующая кафедрой патологической анатомии, профессор, доктор медицинских наук;* ***О.В. Злобина*** *— ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, ассистент кафедры гистологии, цитологии и клеточной биологии, кандидат медицинских наук;* ***Н.Г. Хлебцов —*** *Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов (ИБФРМ) РАН, зав. базовой кафедрой биофизики ФНП СГУ, заведующий лабораторией нанобиотехнологии ИБФРМ РАН, профессор, доктор физико-математических наук;* ***Б.Н. Хлебцов —*** *ИБФРМ РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии, доктор физико-математических наук,* ***В.А. Богатырев*** *— ИБФРМ РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологий, доктор биологических наук.*

MORPHOLOGICAL CHANGES IN LIVER OF LABORATORY ANIMALS AT PROLONGED INTAKE OF GOLD NANOPARTICLES

S. S. Pakhomiy — *Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Department of Pathological Anatomy, Assistant;* ***A.B. Bucharskaya*** *— Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Head of Centre of Collective Use of Research Institute of Fundamental and Clinical Urology and Nephrology, Candidate of Biological Science;* ***N.A. Navolokin —*** *Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Centre of Collective Use of Research Institute of Fundamental and Clinical Urology and Nephrology, Research Assistant;* ***G.N. Maslyakova*** *— Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Head of Department of Pathological Anatomy, Professor, Doctor of Medical Science;* ***O.V. Zlobina*** *— Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Department of Histology, Cytology and Cell Biology, Assistant, Candidate of Medical Science;* ***N.G. Khlebtsov*** *— Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Head of Laboratory of Nanobiotechnology, Professor, Doctor of Physico-Mathematical Science;* ***B.N. Khlebtsov*** *— Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Laboratory of Nanobiotechnology, Chief Research Assistant, Doctor of Physico-Mathematical Science;* ***V.A. Bogatyrev*** *— Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Laboratory of Nanobiotechnology, Chief Research Assistant, Doctor of Biological Science.*

Дата поступления — 17.04.2014 г. Дата принятия в печать — 27.05.2014 г.

Пахомий С. С., Бучарская А.Б., Наволокин Н.А., Маслякова Г.Н., Злобина О.В., Хлебцов Н.Г., Хлебцов Б.Н., Богатырев В.А. **Морфологические изменения в печени лабораторных животных при пролонгированном введении золотых наночастиц. Саратовский научно-медицинский журнал 2014; 10(2): 250–256.**

Цель: оценить выраженность морфологических изменений в печени лабораторных животных при пролонгированном введении функционализованных полиэтиленгликолем золотых наночастиц разного размера в диапазоне 2–50 нм. *Материал и методы*. Эксперимент выполнен на 240 белых беспородных крысах, разделенных на 4 группы. Животным опытных групп вводили перорально золотые наночастицы по определенной схеме. *Результаты*. Морфологические изменения в печени при введении золотых наночастиц зависят как от размера частиц, так и от длительности их введения. Развивающиеся патологические изменения в печени носят обратимый характер, о чем свидетельствует постепенное восстановление структуры органа через 14 дней после окончания эксперимента. *Заключение.* Наиболее выраженные изменения в печени обнаружены в опытных группах с 30-дневным введением 2 и 50 нм золотых наночастиц, что свидетельствует о размерозависимом характере их воздействия.

Ключевые слова: золотые наночастицы, морфология, печень, нанотоксикология.

Pakhomy SS, Bucharskaya AB, Navolokin NA, Maslyakova GN, Zlobina OV, Khlebtsov NG, Khlebtsov BN, Bogatyrev VA. **Morphological changes in liver of laboratory animals at prolonged intake of gold nanoparticles. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2014; 10(2): 250–256.**

Aim: to evaluate the severity of morphological changes in the liver of laboratory animals with prolonged intake of pegilated gold nanoparticles of different sizes from 2 to 50 nm. *Material and methods.* The experiment was performed on 240 albino rats divided into 4 groups. The animals of experimental groups were orally administered the gold nanoparticles in a specific pattern. *Results.* Morphological changes in liver depend on the particle size and the duration of administration. Developing pathological changes in the liver are reversible, as evidenced by the gradual recovery of the liver structure 14 days after administration. *Conclusion.* The most significant changes in the liver were found in the experimental groups with a 30-day administration of 2 and 50 nm gold nanoparticles that show the size-dependent nature of their impact.

Key words: gold nanoparticle morphology, liver, nanotoxicology.

Введение. В настоящее время активно ведутся разработки принципиально новых медицинских технологий, способных улучшить результаты лечения различных заболеваний, в первую очередь злокачественных новообразований. Тераностика, новое направление в медицине, заключающееся в соединении терапевтической и диагностической функций в одном средстве, развивается на основе использования нанотехнологий. Как потенциальные агенты для тераностики активно изучаются золотые наночастицы (ЗНЧ), в том числе для доставки лекарственных веществ, генетического материала, антигенов, для решения задач диагностики и одновременно терапии опухолей [1, 2].

Одновременно с началом широкого применения ЗНЧ в биомедицинских целях возникли вопросы об их возможной токсичности. В настоящее время в экспериментах in vivo большинство опубликованных результатов было получено при внутривенном введении ЗНЧ, в то время как токсические свойства частиц при внутрибрюшинном, респираторном и пероральном введении изучены недостаточно. Данный факт, скорее всего, объясняется поиском путей эффективной доставки конъюгатов ЗНЧ к клеткам-ми-

Ответственный автор — Бучарская Алла Борисовна
Тел.: (8452) 66-97-50
E-mail: allaalla_72@mail.ru

шеням при внутривенном введении. В ранее опубликованных нами статьях, посвященных изучению токсичности металлического золота, отмечено, что введение ЗНЧ сопровождается развитием воспалительной реакции, дистрофическими и некротическими процессами, накоплением частиц в макрофагах и ретикулярных клетках лимфатических узлов, а также активацией клеточного и гуморального иммунитетов [3–5].

Учитывая данные о возможной токсичности ЗНЧ, используемых в терапии злокачественных новообразований, целью проводимого нами исследования стала оценка выраженности и обратимости морфологических изменений в печени лабораторных животных при длительном пероральном введении золотых наночастиц разного размера.

Материал и методы. 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. При разработке модели экспериментального исследования за основу положено «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [6], а также методические указания МУ 1.2.2869–11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

В эксперименте использовали ЗНЧ, синтезированные в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН (г. Саратов): частицы коллоидного золота диаметром 2±1, 15±3 и 50±10 нм с числовой концентрацией 10^{14}, $1.3*10^{12}$ шт/мл и $3.5*10^{10}$ шт/мл соответственно (концентрация золота 57 мкг/мл). Средний размер ЗНЧ определяли по электронно-микроскопическим изображениям на микроскопе Libra-120 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Наночастицы коллоидного золота с размером 15 и 50 нм синтезировали цитратным методом Фрэнса путем восстановления золотохлористоводородной кислоты ($HAuCl_4$, Sigma-Aldrich, USA) цитратом натрия. Наиболее мелкие частицы 2 нм получали по специальным методикам [7]. Для увеличения биодоступности и биосовместимости наночастицы были конъюгированы с полиэтиленгликолем PEG-SH (Nektar, USA).

Учитывая возможность длительного перорального применения ЗНЧ и препаратов на их основе, разделили эксперимент на 2 серии, в каждой серии по 9 опытных групп. Первая серия включала изучение морфологических изменений в печени лабораторных животных при пероральном введении ЗНЧ размерами 2, 15 и 50 нм продолжительностью 8, 16 и 30 дней. Вторая серия была посвящена анализу обратимости выявленных изменений, забор необходимого материала проводили через 14 дней после окончания введения ЗНЧ размерами 2, 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%-м 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.

При морфологическом исследовании с использованием полуколичественных показателей применяли следующие критерии выраженности признака: «-» — признак отсутствует (0%); «+» — слабо выраженный признак (<30%); «++» — умеренно выраженный признак (30–60%); «+++» — сильно выраженный признак (>60%).

Морфометрический анализ гистологических препаратов проводили в 10 полях зрения с использованием системы анализа цифровых изображений микровизора медицинского μVizo-101 ЛОМО. Применяли также стандартный метод подсчета клеточных элементов при увеличении 200, 400 с использованием специализированной морфометрической сетки [8, 9].

Для выявления конгломератов ЗНЧ применяли метод микроскопии темного поля с использованием микроскопа Leica DM 2500 со специальной приставкой для темнопольной микроскопии при 400-кратном увеличении.

Для оценки размерозависимого воздействия ЗНЧ на морфологию печени использовали следующие морфометрические показатели: коэффициент нормализации паренхимы (КНП), количество непаренхиматозных элементов (НПЭ) в состав которых входили лимфоциты, клетки Купфера и клетки Ито и число двуядерных гепатоцитов [10]. 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 гепатоцитам в состоянии дистрофии и некроза [11, 12].

Для изучения пролиферативной активности гепатоцитов проводили иммуногистохимическое исследование с использованием кроличьих поликлональных антител (Anti-Ki67, Abcam, United Kingdom). Выполняли одноэтапный протокол с трипсинизацией — демаскировкой антигена по стандартной схеме проведения иммуногистохимического исследования [10]. Клетки, давшие положительную иммуногистохимическую реакцию, окрашивались в коричневый цвет. Результат реакции оценивали по системе подсчета Histochemical score. Система подсчета включает в себя интенсивность иммуногистохимической окраски по 3-балльной шкале и долю (%) окрашенных клеток и представляет собой сумму произведений процентов, отражающих долю клеток с различной интенсивностью окраски, на балл, соответствующий интенсивности реакции. Интенсивность окраски: 0 — нет окрашивания; 1 — слабое окрашивание; 2 — умеренное окрашивание; 3– сильное.

Формула подсчета:

$$\text{Histochemical score} = \sum P(i) \times i,$$

где, i — интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0 до 3; P (i) — процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

Для обработки полученных в ходе исследований данных использован пакет прикладных статистических программ Statistica 10.0 (StatSoftInc, 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), ошибку среднего арифметического (m). Оценку различий между выборками про-

Таблица 1

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

Исследуемые показатели, M±m (в 30 полях зрения)	Контрольная группа	Длительность введения ЗНЧ размером 2 нм					
		8 дней		16 дней		30 дней	
		В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней
Степень выраженности дистрофии гепатоцитов	--	+/++	+	++/+++	+	+++	+
Степень выраженности полнокровия	+/++	++/+++	+/++	+	++/+++	+	+++
Феномен сепарации крови	--	+/--	+/--	+/--	+	+/--	+
Кол-во гепатоцитов в состоянии дистрофии	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 гепатоцитов в состоянии некроза	0	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*
Общее кол-во 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 Купфера и Ито	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<0,05).

водили с использованием t-критерия Стьюдента. Исследование корреляционной взаимосвязи между количественными признаками осуществляли при помощи метода Пирсона.

Результаты. Установлено, что выраженность и обратимость морфологических изменений в печени определялись как размером ЗНЧ, так и длительностью их введения (табл. 1–3). При этом с увеличением сроков эксперимента морфологические изменения в органе приобретали более выраженный характер.

В группах 8-дневного введения наиболее значимые морфологические изменения обнаружены при введении ЗНЧ размерами 2 и 50 нм: в цитоплазме гепатоцитов наблюдалась зернистая дистрофия и умеренно выраженные некробиотические изменения, в то время как в группе животных с введением ЗНЧ 15 нм дистрофические изменения носили незначительный характер.

В результате исследования установили, что при 8-дневном введении ЗНЧ во всех опытных группах наблюдалось повышение количества дистрофически и некротически измененных гепатоцитов, уменьшение числа неизмененных клеток и, как следствие, снижение КНП. Максимальное количество гепатоцитов в состоянии дистрофии и некроза обнаружено в группе введения ЗНЧ 2 нм — 124,58±9,7 (P<0,001); минимальное — в группе введения ЗНЧ 15 нм (82,7±6,18, P<0,001). Уменьшение количества неизмененных клеток и повышение числа гепатоцитов в состоянии дистрофии и некроза сопровождалось снижением КНП до 1,15±0,12 (ЗНЧ 2 нм) и 1,2±0,126 (ЗНЧ 50 нм).

Длительное пероральное введение ЗНЧ сопровождалось повышением во всех опытных группах животных с 8-дневным введением ЗНЧ числа НПЭ как за счет лимфоцитов, так и за счет клеток Купфера и Ито. Полученные результаты свидетельствуют о наличии активирующего влияния ЗНЧ на моноцитарно-макрофагальную систему печени. Незначительное увеличение числа двуядерных гепатоцитов говорит об усилении регенераторных процессов.

Для уточнения размерозависимого влияния ЗНЧ на морфологическую картину печени выполнен корреляционный анализ, в ходе которого обнаружено большое количество достоверных отрицательных взаимосвязей между исследуемыми показателями и размером ЗНЧ. Важным моментом, установленным при корреляционном анализе, является тот факт, что максимальное повреждающее действие на печень оказали ЗНЧ размером 2 нм.

При гистологическом исследовании, выполненном через 14 дней после окончания введения ЗНЧ, во всех опытных группах наблюдалось восстановление морфологической картины печени: уменьшались степень выраженности дистрофии и некроза гепатоцитов, полнокровия сосудов и отека стромы. По данным морфометрического исследования, практически все исследуемые морфологические показатели печени приближались к контрольным значениям, кроме КНП и общего числа НПЭ в группах животных, которым вводили ЗНЧ 2 и 50 нм. Обращает на себя внимание увеличение количества двуядерных гепатоцитов во всех группах: в группе введения ЗНЧ 2 нм — в 2,9 раза; ЗНЧ 15 нм — в 3,1 раза и ЗНЧ 50 нм — в 3,2 раза.

С увеличением длительности введения ЗНЧ до 16 дней выраженность морфологических изменений нарастала: во всех опытных группах наблюдались дистрофия и некроз гепатоцитов, а также различной степени выраженности признаки нарушения кровообращения в органе, особенно в группе животных с введением ЗНЧ размером 50 нм. По данным морфометрического анализа, минимальные значения КНП получены в группах введения ЗНЧ 2 и 50 нм (0,41±0,05 и 0,31±0,07 соответственно) (рис. 1). Общее число НПЭ увеличивалось во всех опытных группах как за счет повышения количества лимфоци-

Таблица 2

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

Исследуемые показатели, M±m (в 30 полях зрения)	Контрольная группа	Длительность введения ЗНЧ размером 15нм					
		8 дней		16 дней		30 дней	
		В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней
Степень выраженности дистрофии гепатоцитов	--	+	+/--	++	+	++	+
Степень выраженности полнокровия	+/++	+/++	+/++	+	++	++	++/+++
Феномен сепарации крови	--	--	+/--	--	--	--	+
Кол-во гепатоцитов в состоянии дистрофии	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 гепатоцитов в состоянии некрозов	0	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
Общее 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 Купфера и Ито	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<0,05).

Таблица 3

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

Исследуемые показатели, M±m (в 30 полях зрения)	Контрольная группа	Длительность введения ЗНЧ размером 50 нм					
		8 дней		16 дней		30 дней	
		В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней	В конце введения	Через 14 дней
Степень выраженности дистрофии гепатоцитов	--	++	+	++/+++	+	+++	+
Степень выраженности полнокровия	+/++	+/++	+++	+/++	++/+++	++/+++	++/+++
Феномен сепарации крови	--	--	+/--	--	--	--	+/--
Кол-во гепатоцитов в состоянии дистрофии	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 гепатоцитов в состоянии некрозов	0	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*
Общее 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 Купфера и Ито	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<0,05).

тов, так и за счет увеличения числа клеток Купфера и Ито.

При изучении обратимости во всех опытных группах с 16-дневным введением ЗНЧ выраженность дистрофических и некротических изменений в гепатоцитах уменьшалась (рис. 2). Следует отметить, что минимальное количество гепатоцитов в состоянии дистрофии (44,3±6,4; P<0,001) и максимальное значение КНП (8,6±0,78; P<0,001) были получены в группе животных, которым вводили ЗНЧ 15 нм. Изменения со стороны моноцитарно-макрофагальной системы печени в группах введения ЗНЧ 2 и 50 нм носили однонаправленный характер и проявлялись в виде увеличения практически в два раза общего количества НПЭ как за счет повышения количества лимфоцитов, так и клеток Купфера и Ито. Увеличение количества двуядерных гепатоцитов наблюдалось во всех опытных группах: в 3 раза в ответ на

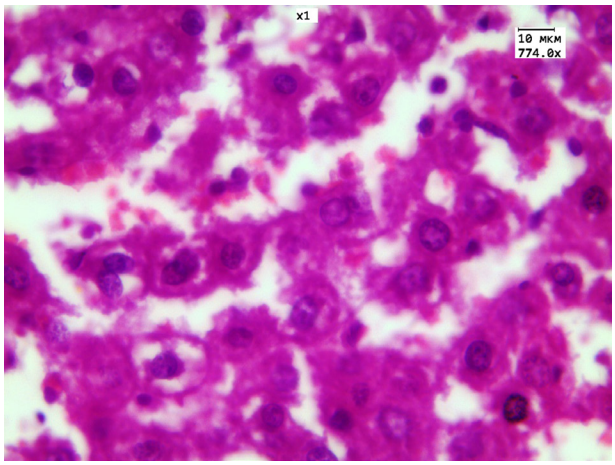


Рис. 1. Умеренно выраженные дистрофические изменения гепатоцитов. ЗНЧ размером 2 нм, 16-дневное введение. Окр. Г.-Э. Ув. 774

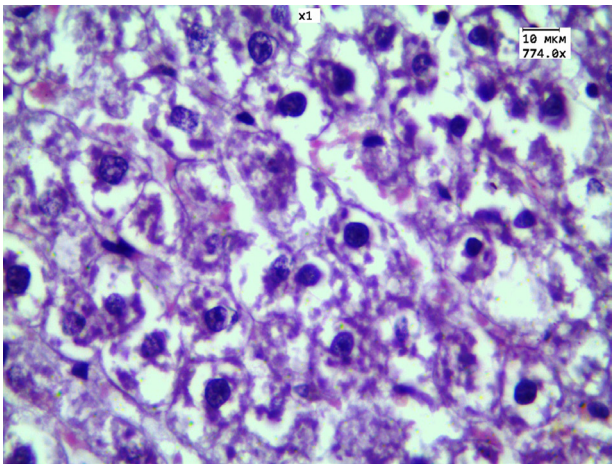


Рис. 4. Выраженная дистрофия гепатоцитов при 30-дневном введении ЗНЧ 50 нм. Окр. Г.-Э. Ув. 774

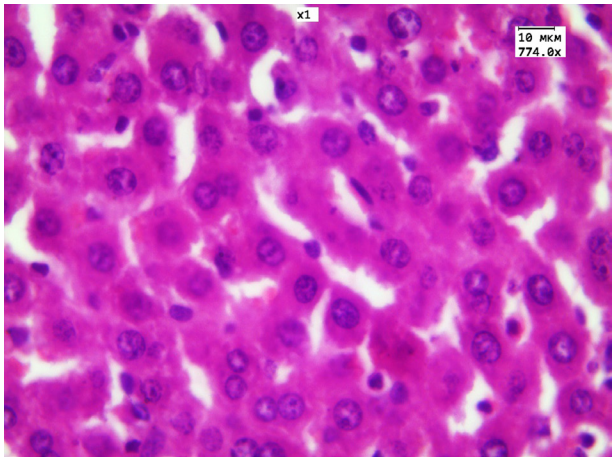


Рис. 2. Слабая дистрофия гепатоцитов на 14-й день после окончания 16-дневного введения ЗНЧ 2 нм. Окр. Г.-Э. Ув. 774.0

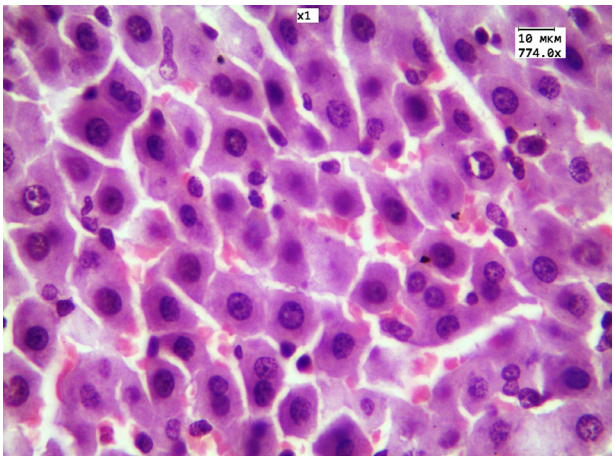


Рис. 5. Незначительная степень дистрофии гепатоцитов на 14-й день после окончания введения ЗНЧ 2 нм в течение 30 дней. Окр. Г.-Э. Ув. 774.0

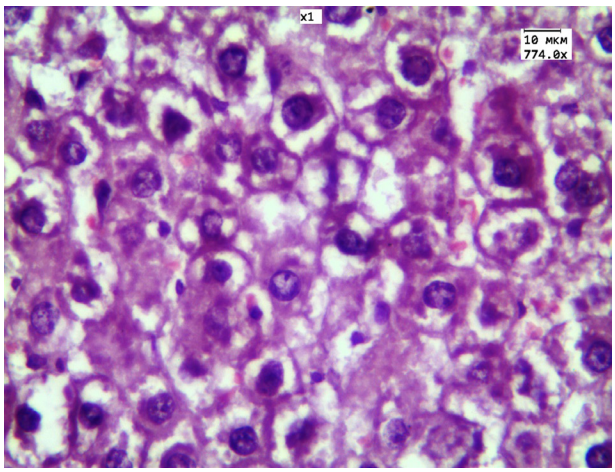


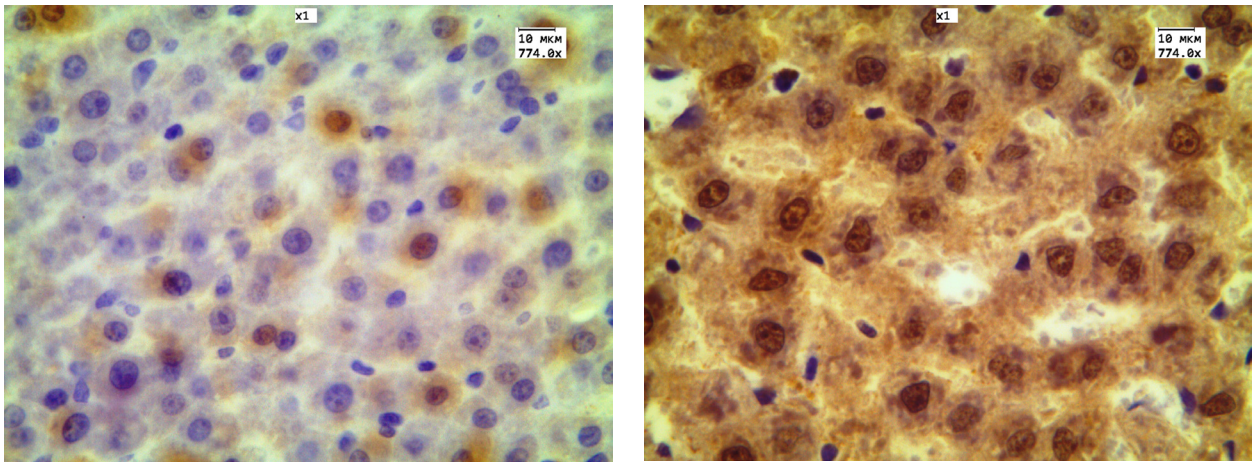
Рис. 3. Выраженные дистрофические изменения гепатоцитов при 30-дневном введении ЗНЧ размером 2 нм. Окр. Г.-Э. Ув. 774

введение ЗНЧ размером 2 нм, в 2,3 раза — ЗНЧ 15 нм и в 2,8 раза — ЗНЧ 50 нм.

Наиболее выраженные изменения найдены в группах 30-дневного введения ЗНЧ размерами 2 и 50 нм. В препаратах данных групп обращало на себя внимание отсутствие балочного строения, выраженная вакуольная дистрофия гепатоцитов (рис. 3; 4). Следует отметить, что в группе животных, которым вводили ЗНЧ 15 нм, балочное строение гепатоцитов было сохранено, отмечалась умеренная дистрофия гепатоцитов.

По данным морфометрического исследования, во всех группах с 30-дневным введением ЗНЧ отмечалось дальнейшее уменьшение количества неизмененных гепатоцитов и КНП, при этом минимальные значения КНП (0,09±0,03) получены при введении ЗНЧ 50 нм. Общее число НПЭ печени увеличилось в два раза как за счет повышения количества лимфоцитов, так и за счет увеличения числа клеток Купфера и Ито. Количество двуядерных гепатоцитов увеличивалось незначительно.

При морфологическом исследовании печени через 14 дней после окончания 30-дневного введения ЗНЧ наблюдалось частичное восстановление струк-



а) б)

Рис. 6. Экспрессия антигена ядерного белка Ki-67: а) в контрольной группе; б) при 30-дневном введении ЗНЧ 2 нм. ИГХ-реакция с антителами к Ki-67-антигену. Ув. 774

туры органа, уменьшалась выраженность дистрофии и некроза, значительное увеличение КНП (рис. 5). В то же время изменения со стороны моноцитарно-макрофагальной системы носили разнонаправленный характер. В группах животных с введением ЗНЧ 2 и 50 нм во всех случаях к 14-м суткам и по окончании их введения регистрировали дальнейшее повышение количества НПЭ. Исключение составили группы животных, которым вводили ЗНЧ 50 нм в течение 30 дней, где на 14-е сутки после окончания введения отмечали 1,5-кратное снижение количества НПЭ по отношению к исходному значению и с введением ЗНЧ 15 нм, в которой на 14-й день после прекращения 8- и 30-дневного введения ЗНЧ также отмечалась тенденция к снижению общего числа НПЭ.

Учитывая, что в печени в группах 30-дневного введения ЗНЧ были получены наиболее выраженные морфологические изменения, провели ИГХ-исследование с маркером Ki-67 для оценки пролиферативной активности гепатоцитов в ответ на повреждающее воздействие ЗНЧ. Иммуногистохимическая реакция с маркером Ki-67 наблюдалась во всех группах животных ЗНЧ: среднее значение гистосчета в группе введения ЗНЧ размером 2 нм составило 144,4±12,4, ЗНЧ размером 15 нм — 141,5±10,3, ЗНЧ размером 50 нм — 150,3±13,2 (при контрольных значениях 4,14±1,04, $P<0,001$) (рис. 6). При исследовании обратимости среднее значение гистосчета уменьшилось и составило в группе введения ЗНЧ размером 2 нм 102,3±8,2, ЗНЧ размером 15 нм — 98±7,4, ЗНЧ размером 50 нм — 123±11,5.

Обсуждение. Увеличение числа двуядерных гепатоцитов мы расценивали как проявление процессов регенерации, направленных на восстановление печёночной ткани за счёт увеличения количества функционирующих гепатоцитов. Это согласуется с мнением В.В. Садовниковой и др. (2001) о том, что повышение количества функционирующих гепатоцитов свидетельствует об усилении белково-синтетической функции печени, что может расцениваться как единый компенсаторно-приспособительный механизм, направленный на нормализацию структуры и функции органа [13].

При морфологическом исследовании печени не обнаружено скопления ЗНЧ при использовании световой микроскопии, ни при микроскопии методом темного поля. Мы зарегистрировали лишь косвенные признаки присутствия ЗНЧ в виде дистрофических и некротических изменений паренхимы и активации моноцитарно-макрофагальной системы.

Заключение. Таким образом, морфологические изменения в печени при длительном пероральном введении ЗНЧ зависят как от размера частиц, так и от длительности их введения. Развивающиеся патологические изменения в печени носят обратимый характер, о чем свидетельствует постепенное восстановление структуры органа через 14 дней после окончания эксперимента.

Конфликт интересов на заявляется.

References (Литература)

1. Khlebtsov NG, Dykman LA. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. Chem Soc Rev 2011; 40: 1647–1671.

2. Khlebtsov BN, Panfilova EV, Khanadeev VA, et al. Nanocomposites containing silica-coated gold-silver nanocages and Yb-2,4-dimethoxyhematoporphyrin: Multifunctional capability of IR-luminescence detection, photosensitization, and photothermolysis. ACS Nano 2011; 5 (9): 7077–7089.

3. Navolokin NA, Maslyakova GN, Bucharskaya AB, et al. Dynamics of morphological and biochemical changes in laboratory animals with inoculated kidney cancer at intravenous gold nanoshells. Proceedings of the Saratov University: new series. Series: Physics 2012; 12 (2): 38–43. Russian (Наволокин Н.А., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б. и др. Динамика морфологических и биохимических изменений у лабораторных животных с перевитым раком почки при внутривенном введении золотых нанооболочек. Известия Саратовского университета: новая серия. Серия: Физика 2012; 12 (2): 38–43.)

4. Zlobina OV, Pachomius SS, Bucharskaya AB, et al. Analysis of accumulation and biodistribution of gold nanoparticles in the mesenteric lymph nodes at peroral administration. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2013; 8 (1): 17–20. Russian (Злобина О.В., Пахомий С. С, Бучарская А.Б. и др. Анализ накопления и биораспределения золотых наночастиц в мезентериальных лимфатических узлах при пероральном введении. Саратовский научно-медицинский журнал 2013; 8 (1): 17–20.)

5. Maslyakova GN, Pakhomy SS, Bucharskaya AB, et al. The morphological changes in the organs of laboratory animals after prolonged oral administration of gold nanoparticles. Saratov Journal of Medical Scientific Research 2013; 9 (2): 208–213. Russian (Маслякова Г.Н., Пахомий С. С, Бучарская А.Б. и др. Морфологические изменения в органах лабораторных животных при длительном пероральном введении золотых наночастиц. Саратовский научно-медицинский журнал 2013; 9 (2): 208–213.)

6. Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological agents / ed. Habriev RY. Moscow: Medicine,

2005; 829 p. Russian (Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.Ю. Хабриева. М: Медицина, 2005; 829 с.)

7. Dykman LA, Bogatyrev VA, Shchegolev SY, Khlebtsov NG. Gold nanoparticles: synthesis, properties and biomedical applications. Moscow: Nauka, 2008; 319 p. Russian (Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С. Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008; 319 с.)

8. Avtandilov GG. Introduction to quantitative and pathological morphology. Moscow: Medicine, 1980; 216 p. Russian (Автандилов Г.Г. Введение в количественную и патологическую морфологию. М: Медицина, 1980; 216 с.)

9. Avtandilov GG. Medical morphometry. M.: Medicine, 1990; 384. Russian (Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990; 384 с.

10. Petrov SV, Reichlin NT. Guidelines for immunohistochemical diagnostics of tumors. Kazan: Titul, 2004; 452 p. Russian (Петров С. В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей. Казань: Титул, 2004; 452 с.)

11. Solopaeva IM. Stimulation of regeneration of normal and diseased liver: DSc diss. Gor'ky, 1969; 229 p. Russian (Солопаева И.М. Стимуляция регенерации нормальной и патологически измененной печени: дис. д-ра мед. наук. Горький, 1969; 229 с.)

12. Solopaeva IM, Solopaev BP. Stimulation of regeneration of the diseased liver and human chorionic gonadotropin. Nizhny Novgorod: Univ NI Lobachevsky, 1991; 147 p. Russian (Солопаева И.М., Солопаев Б.П. Стимуляция регенерации патологически измененной печени и хорионический гонадотропин. Н. Новгород: Изд-во ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 1991; 147 с.)

13. Sadovnikova VV, Sadovnikova IV, Ivanova LN. Morphological changes in the liver of rats with drug-induced hepatitis and toxic stimulation of reparative processes. Morphology 2001; 120 (6): 63–65. Russian (Садовникова, В. В., Садовникова И.В., Иванова Л.Н. Морфологические изменения в печени крыс при токсическом медикаментозном гепатите и стимуляции репаративных процессов. Морфология 2001; 120 (6): 63–65.)