

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС ПРИ ВНУТРИМЫШЕЧНОМ ВВЕДЕНИИ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ ТИПА Cu10x

С использованием иммуногистохимического метода выявлены особенности структурно-функциональной реорганизации селезенки крыс при однократном и многократном внутримышечном введении наночастиц меди.

Ключевые слова: селезенка, наночастицы, иммуногистохимия.

Среди разрабатываемых способов адресной доставки лекарственных препаратов перспективным является использование жизненно необходимых металлов в форме наночастиц как основы для создания носителей этих препаратов. Среди наноразмерных форм заслуживают внимания наночастицы меди типа Cu10x, полученные в условиях контролируемого синтеза с последующей модификацией кислородом и проведенной материаловедческой аттестацией методами электронной сканирующей и трансмиссионной микроскопии, рентгенофазового анализа [1, 2].

В исследовании органов иммунной системы на современном этапе достигнуты существенные успехи [3, 4]. Структурно-функциональная организация селезенки как в норме у человека, так и в эксперименте на животных достаточно хорошо изучена [5, 6]. Между тем в литературе нет сведений о характере структурной перестройки и минеральном составе органа при введении наноразмерных форм.

Цель: выявить особенности структурно-функциональной реорганизации селезенки при внутримышечном введении наночастиц меди типа Cu10x для дальнейшего решения вопроса о безопасности их введения в организм и использования в качестве субстанции для биопрепаратов.

Материалы и методы

Исследования выполнены в условиях экспериментально-биологической клиники (вивария) Оренбургского государственного университета на 60-ти белых крысах-самцах линии Вистар массой 150-180 г, которым 1 раз в неделю на протяжении 12 недель вводили в бедрен-

ную группу мышц суспензию наночастиц меди типа Cu10x в дозе 2,0 мг/кг массы животного. Наночастицы меди типа Cu10x представляют собой сферические частицы размером $103,0 \pm 2,0$ нм с оксидной пленкой толщиной 6 нм, полученные в Институте энергетических проблем химической физики РАН (Москва). Методом рентгенофазового анализа определен их состав: меди кристаллической 96%, меди оксида 4%. Забой животных проводили путем декапитации под нембуталовым наркозом по следующей схеме: через сутки после первой инъекции – 1 группа, через 7 суток после первой инъекции – 2 группа, через сутки после второй инъекции – 3 группа, через 7 суток после второй инъекции – 4 группа, через сутки после третьей инъекции – 5 группа, через 7 суток после третьей инъекции – 6 группа, через 7 суток после четвертой инъекции – 7 группа, через 7 суток после 12-й инъекции – 8 группа. Животным контрольной группы вводили дистиллированную воду и убой проводили в те же сроки.

В ходе проведения эксперимента соблюдались правила проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приказ №755 от 12.08.1977 МЗ СССР).

Для световой микроскопии и иммуногистохимического исследования селезенку фиксировали в 10% нейтральном формалине. Парафиновые срезы толщиной 5-6 мкм окрашивали гематоксилином Майера – эозином. При помощи окулярной точечной сетки-вставки определяли относительную объемную плотность белой и красной пульпы селезенки. На условной единице площади подсчитывали число клеток лимфоидного ряда в зонах белой пульпы селезенки. Иммуногистохимические исследования прово-

дили на парафиновых срезах при помощи моноклональных антител (Ki-67, Caspase-3, Bcl-2) и системы визуализации фирмы Bio Genex Super Sensitive Detection System, США. Для оценки пролиферативной активности клеток белой пульпы селезенки выявляли экспрессию маркера Ki-67, для определения готовности клеток белой пульпы к гибели путем апоптоза исследовали экспрессию ccrp-32, а также возможного угнетения апоптоза – Bcl-2. Производили подсчет иммунопозитивных клеток на 1000 и выражали в %.

Анализ исследуемых образцов осуществлялся в лаборатории АНО «Центр биотической медицины», г. Москва (аттестат аккредитации ГСЭН.RU.ЦОА.311, регистрационный номер в Государственном реестре РОСС RU.0001.513118 от 29 мая 2003 г.). Все полученные в ходе исследования данные были подвергнуты статистической обработке с использованием программ Excel, Statistica 5.

Результаты и их обсуждение

Морфометрическое исследование белой и красной пульпы селезенки показало, что у всех групп экспериментальных животных наблюдается повышение относительной объемной плотности (ООП) белой пульпы по сравнению с контрольной группой, о чем свидетельствуют представленные в таблице 1 показатели отношения ООП белой пульпы к красной. Наибольшего значения этот показатель в селезенке достигается на седьмые сутки после второй инъекции и остается достоверно выше и в первые сутки после третьей инъекции по сравнению с контрольной группой.

Относительная объемная плотность лимфоидных фолликулов увеличивается по срав-

нению с контролем во всех экспериментальных группах и максимального значения достигает на седьмые сутки после второй инъекции. Подобная картина увеличения ООП лимфоидных фолликулов обнаруживается при введении в организм экспериментальных животных средств, обладающих иммуностимулирующим действием [7]. Однако увеличение ООП лимфоидных фолликулов в селезенке животных на седьмые сутки после второй инъекции наночастиц меди связано с увеличением мантийной и особенно краевой зоны фолликулов, что позволяет предположить о возможном нарушении процессов дифференцировки лимфоцитов и их выхода в синусы красной пульпы.

Возможной причиной развивающихся изменений в лимфоидных фолликулах селезенки является увеличение в два раза по сравнению с контролем содержания меди в органе (рис. 1), что подтверждается исследованиями Charpuis P. et al. (1998) о влиянии тканевого пула меди на процессы образования иммунокомпетентных клеток.

При исследовании ООП периартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ) выявлена тенденция к увеличению относительной объемной плотности Т-зон, которая наиболее выражена на седьмые сутки после второй инъекции и первые сутки после третьей инъекции (таблица 1), а затем показатель недостоверно снижается по сравнению с контролем на седьмые сутки после 12-й инъекции.

Исследование плотности клеток лимфоидного ряда (рис. 2) в периартериальных лимфоидных муфтах после введения наночастиц выявило ее повышение по сравнению с контролем в 1, 2, 3, 4 экспериментальных группах преимущественно за счет малых лимфоцитов. Плот-

Таблица 1. Показатели относительной объемной плотности структур селезенки (%)

Группы	Отношение ООП белой пульпы к ООП красной	Лимфоидные фолликулы	Периартериальные лимфоидные муфты	Герминативные центры
К	0,71±0,05	18,6±0,9	22,9±1,1	13,2±0,7
1	1,1±0,07	25,6±1,2	26,7±0,9	17,9±1,0
2	1,0±0,04	24,4±0,8	25,8±0,8	18,2±0,9
3	0,86±0,08	22,3±1,1	24,5±1,0	16,8±0,7
4	1,35±0,07	27,4±1,3	30,1±1,2	19,1±1,0
5	1,22±0,05	25,8±0,9	29,6±0,9	21,3±0,8
6	1,02±0,04	23,6±1,2	26,9±0,8	20,9±1,0
7	1,04±0,07	24,3±0,9	25,9±0,9	21,6±0,9
8	0,85±0,04	23,9±1,0	20,1±0,9	12,6±0,8

ность малых лимфоцитов в ПАЛМ селезенки контрольной группы составляет $65,0 \pm 1,3\%$, а в опытных (1, 2, 3, 4) – $75,0 \pm 2,1\%$, $73,0 \pm 1,1\%$, $72,0 \pm 0,9\%$, $69,0 \pm 1,4\%$ соответственно. В селезенке животных 5, 7, 8 групп происходит уменьшение плотности малых лимфоцитов и ретикулярной стромы, но увеличивается количество макрофагов по сравнению с контролем ($1,0 \pm 0,5\%$) в названных экспериментальных группах соответственно, 5 группе – $3,5 \pm 0,4\%$, седьмой – $3,0 \pm 0,7\%$, в восьмой – $2,7 \pm 0,5\%$. Кроме того, в ПАЛМ селезенки этих групп исследования выявляются клетки с признаками деструкции.

При введении наночастиц меди наблюдается увеличение ООП герминативных центров (ГЦ) фолликулов (таблица 1), наибольшие показатели отмечены в 4 и особенно в 5 экспериментальной группе, однако в 8 группе исследования (седьмые сутки после 12-й инъекции) выявляется уменьшение ООП герминативных цен-

тров, в них обнаруживаются скопления макрофагов с фагоцитированными лимфоцитами или их фрагментами в виде хромофильных телец.

Исследование плотности клеток лимфоидного ряда в герминативных центрах (рис. 2) показало, что на протяжении всего периода эксперимента наблюдается ее уменьшение. Наибольшее снижение плотности клеток лимфоидного ряда обнаруживается в 4, 5, 6, 8 группах исследования. Уменьшение плотности клеток на седьмые сутки после второй инъекции (4 группа) и на первые сутки после третьей инъекции (5 группа) связано с увеличением количества бластных форм, имеющих большой объем цитоплазмы. В 8 группе (седьмые сутки после 12 инъекций) уменьшение плотности клеток лимфоидного ряда связано с увеличением количества макрофагов.

При иммуногистохимическом исследовании пролиферативной активности клеток лим-

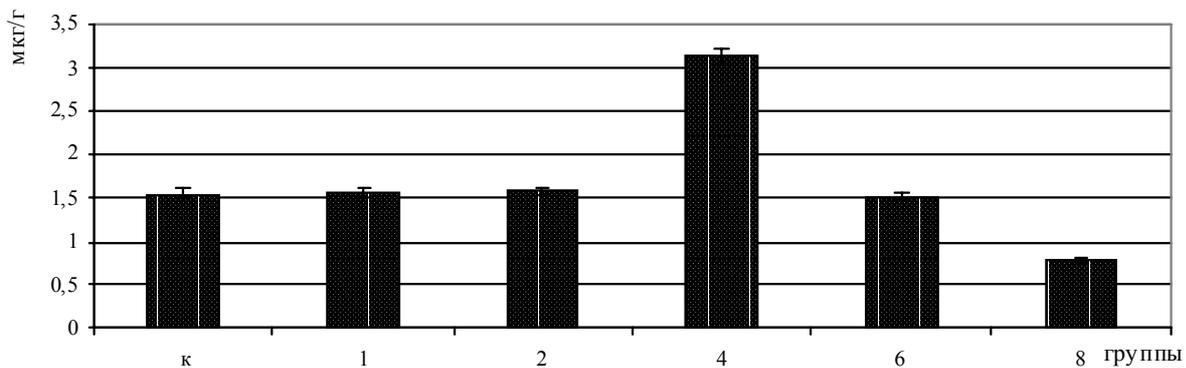


Рисунок 1. Содержание меди в селезенке

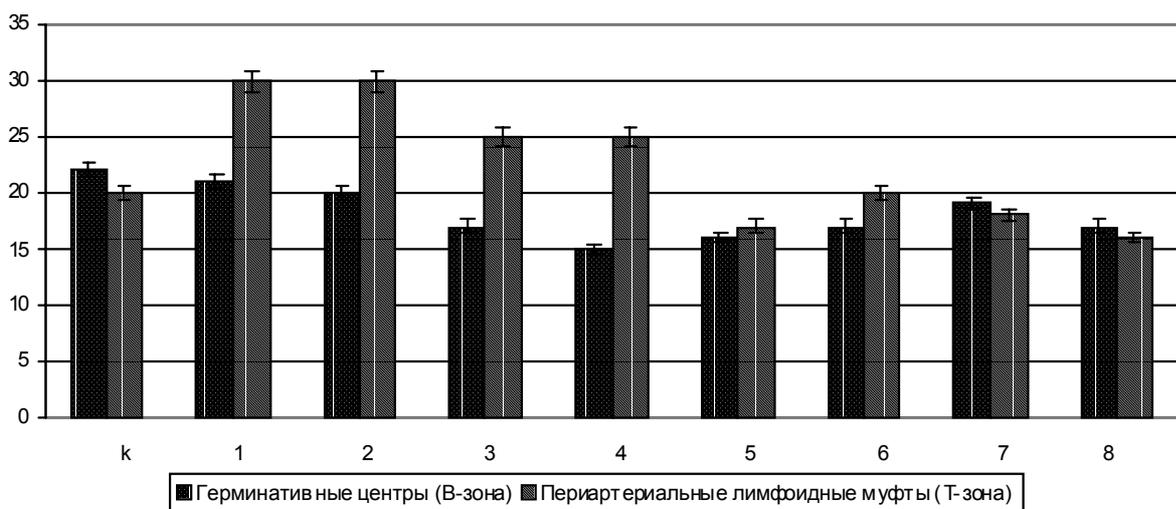


Рисунок 2. Плотность клеток лимфоидного ряда в зонах белой пульпы селезенки. По оси ординат – число клеток на условную единицу площади; по оси абсцисс – группы животных

фоидных фолликулов селезенки с помощью антител Ki-67 выявлено повышение в два раза по сравнению с контролем экспрессии Ki-67 у животных 4 группы (седьмые сутки после второго введения наночастиц) и понижение в 1,5 раза экспрессии этого маркера у животных на 7 сутки после 12-й инъекции наночастиц меди по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

При исследовании готовности клеток к апоптозу выявлено снижение экспрессии сср-32 (Caspase-3) животных на 7-е сутки после второй инъекции наночастиц, свидетельствующих о снижении готовности клеток к запланированной гибели. На 7-е сутки после 12 инъекции увеличивается число клеток лимфоидных фолликулов селезенки, экспрессирующих сср-32, и снижается численность клеток, дающих положительную реакцию на Vcl-2. Полученные сведения по определению готовности клеток белой пульпы к запланированной гибели и возможного ее угнетения в разных экспериментальных группах подтверждают модулирующее влияние меди на апоптоз.

Заключение

1. Однократное введение наночастиц меди не нарушает структурный гомеостаз селезенки, а приводит лишь к умеренному повышению функциональной активности белой пульпы, о чем свидетельствуют повышение ее относительной объемной плотности, ООП герминативных центров, ПАЛМ и показатели численности клеток на условной единице площади в этих зонах.

2. Морфометрические показатели белой пульпы после 2, 3 и 4-й инъекции наночастиц также свидетельствует о повышении ее функциональной активности. Более значимые изменения морфометрических показателей белой пульпы наблюдаются на 7-е сутки после второго введения наночастиц меди. Увеличение лимфоидных фолликулов после второго введения наночастиц меди происходит не только за счет увеличения герминативных центров, где происходят процессы бластной трансформации и размножения лимфоцитов, но в большинстве фолликулов за счет мантийной и краевой зон, где происходят процессы дифференцировки и выхода клеток в красную пульпу. Увеличение этих зон, как мы полагаем, – результат нарушенного местного гомеостаза, связанного с выявленным нарушением микроэлементного статуса органа в этой экспериментальной группе.

3. Многократное введение (12 инъекций) приводит к снижению ООП герминативных центров и ПАЛМ, уменьшению численности клеток лимфоидного ряда на условной единице площади в ПАЛМ и ГЦ за счет увеличения в этих зонах макрофагов и клеток с признаками деструкции. На 7-е сутки после 12-й инъекции уменьшается пролиферативная активность клеток лимфоидных фолликулов, о чем свидетельствует снижение в 1,5 раза экспрессии маркера Ki-67 по сравнению с контролем, повышается готовность клеток к апоптозу, проявляющаяся повышением числа клеток экспрессирующих сср-32 и снижением число клеток экспрессирующих Vcl-2.

12.01.2010

Список использованной литературы:

1. Смирнова Т.С. Ягмуров О.Д. Строение и функции селезенки // Морфология, 1993. - № 5-6. – С.142 – 160.
2. Баранов В.Н. Современные представления о тонкой структуре селезенки. Арх. анат., 1974. -Т. 57. - №12. - С. 91 – 100.
3. Армиранидзе М.В. Морфологическая характеристика селезенки и печени после резекции части селезенки и спленэктомии. Изв. АН СССР, сер. биол., 1989. -Т. 15. - №5. -С. 302 – 306.
4. Каспарова И.С., Азнаурян А.В., Акопджанян Э.С. Гистоферментативная характеристика лимфоузлов и селезенки при антигеном воздействии. Журн. экспер. и клин. мед., 1982. - №1. - С. 15 – 19.
5. Чучкова Н.Н., Кормилина Н.В. Морфометрическая характеристика некоторых органов иммуногенеза крыс при стимуляции криоспленоперфузатом. //Морфология. -2003. -Т.124. -№5. -С.82
6. Koundrine A.V. Trace elements and apoptosis //Trace Elem. Biol. Med. 1998. - №3. - P 17-27.
7. Deem R. L. Britswan L. J., Yargan S.R. // Cell. Immunol. 1987. V.110. №2. P. 253.
8. Cappuis P., Aral B., Ceballos-Picot I. Copper related diseases // Metal Ions in Biology and Medicine/ Eds Ph Collery, P. Bratter, V. Negretti de Bratter, L. Khassanova, J. C. Etienne. Paris: John Libbey Eurotex. 1998. Vol. 5. P. 729-736.

**Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований
№08-04-13544 - офи_ц**

Сведения об авторах:

Полякова Валентина Сергеевна, зав. кафедрой патологической анатомии Оренбургской государственной медицинской академии, доктор медицинских наук, профессор

E-mail – inst_bioelement@mail.ru

Глушченко Наталья Николаевна, руководитель лаборатории Института энергетических проблем химической физики РАН, доктор биологических наук, профессор

E-mail – nnglu@mail.ru

Сизова Елена Анатольевна, доцент кафедры общей биологии Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук

E-mail – Sizova.L78@yandex.ru

Лебедев Святослав Валерьевич, зав. лабораторией Института биоэлементологии Оренбургского государственного университета, доктор биологических наук

460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail – lsv74@list.ru

Sizova E.A., Lebedev S.V., Polyakova V.S., Glushchenko N.N.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL REORGANIZATION OF THE RAT SPLEEN IN INTRAMUSCULAR INJECTION OF CU 10X COPPER NANOPARTICLES

By using immuno-histochemical method we revealed features of structural and functional reorganization of the rat spleen in single and multiple intramuscular injection of copper nanoparticles.

Key words: spleen, nanoparticles, immunohistochemistry.

Bibliography:

1. Smirnova T.S. Jagmurov O.D. Structure and functions of a spleen // Morphology, 1993.-№5-6. – P. 142 - 160.
2. Baranov V.N. Modern's rams of representation about thin structure of a spleen. anat., 1974.-Т. 57.-№12.-P. 91 - 100.
3. Armiranidze M.V. Morphological the characteristic of a spleen and a liver after a resection of a part of a spleen and splenectomy. Not. AN the USSR, sulfurs. biol., 1989.-Т. 15.-№5.-P. 302 - 306.
4. Kasparova I.S., Aznaurjan A.V., Akopdganyan E.S. Gistofermentativnaja the characteristic lymph nodes and spleens at an antigene influence. Journ. exam. and a wedge. honey., 1982.-№1.-P. 15-19.
5. Chuchkova N.N., Kormilina N.V. Morfometricheskaja the characteristic of some bodies immunogenesis rats at stimulation kriospleenperfuzat span lang// Morphology, -2003.-Т.124.-№5.-P.82