

УДК 615.015.12

НЕКОТОРЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ КАРДИОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

**Петрицкая Е.Н.¹, Абаева Л.Ф.¹, Рогаткин Д.А.¹,
Шумский В.И.¹, Липатова В.А.², Куцев С.И.², Ботчей В.М.²**

¹ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф.Владимирского (МОНИКИ)

²ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И.Пирогова, Москва
E-mail: medphys@monikiweb.ru

Статья посвящена изучению возможных токсических изменений в миокарде при длительном пероральном введении наночастиц золота сферической формы и диаметром 2 нм экспериментальным взрослым белым мышам. Полученные результаты указывают на происходящие дегенеративные изменения миокарда, которые могут приводить к морфофункциональной несостоятельности работы сердца в целом.

Ключевые слова: наночастицы, золото, токсичность, миокард.

В последние годы наночастицы золота используются в разных областях промышленности: в химии для получения катализаторов, в электронике – для создания новых материалов, в биологии – для разработки сенсоров, в медицине – для диагностики и лечения некоторых заболеваний, а также в качестве основы для систем доставки лекарственных средств против рака и против внутриклеточных паразитов *Toxoplasma gondii* [12]. Немаловажной проблемой является изучение потенциальной опасности загрязнения наночастицами окружающей среды, разработка критериев их безопасности для здоровья людей, особенно занятых в их производстве и постоянно с ними контактирующих, а также представителей науки, ежедневно исследующих те или иные свойства наночастиц. Контакт с наночастицами может явиться фактором риска развития в будущем у рабочих наноиндустрии неизвестных ранее нозологических форм профессиональных заболеваний [2, 4, 5].

По данным литературы, размер, заряд поверхности и форма наночастиц золота являются ключевыми факторами, потенциально определяющими развитие токсичности применяемых в медицине золотосодержащих комплексов [6, 7, 13]. Малые размеры наночастиц позволяют им проникать через любые естественные барьеры (эпителий, слизистые) в клетки различных органов и тканей организма и в мозг, преодолевая гематоэнцефалический барьер. Кроме того, одним из путей попадания наночастиц металлов в мозг человека и животного является интраназальный путь через ольфакторный тракт в центральную нервную систему [17].

У.Рап и соавт. [12] исследовали цитотоксичность наночастиц золота в зависимости от их размера. Авторы установили, что нанокластеры золо-

та размером 1,4 нм селективно и необратимо связываются с большой бороздой В-ДНК и вызывают значительно большую степень токсичности, чем более крупные частицы. По данным других авторов, золото обладает нефротоксичностью и может вызывать эриптоз (запрограммированную гибель эритроцитов) [15]. В.Д.Ситхрани и соавт. [7] исследовали транспорт наночастиц золота размером 14, 50 и 74 нм в клетки линии HeLa и обнаружили, что сферические частицы размером 50 нм быстрее поступают внутрь клетки эндоцитозом, чем 14 и 74 нм.

Большая часть данных о токсичности наночастиц золота получена в экспериментах *in vitro*, и их безопасность для живых систем достоверно не исследована. Не учтено также их влияние на разновозрастные категории экспериментальных животных [4]. По данным литературы, отмечается разноречивый характер токсического влияния наночастиц золота на организм экспериментальных животных. Так, исследования Е.В.Загайновой и соавт. [1] показали, что после внутривенного введения наночастиц золота мышам было отмечено отсутствие токсичности, что согласовывалось с данными Е.Е.Сопног и соавт. [8]. Ни летальности, ни поведенческих изменений не выявлено в течение двухнедельного периода наблюдений, а патоморфологические исследования в тканях мозга, сердца, легких, печени и селезенки показали изменения в их структуре. Авторы полагают, что все отклонения были обратимыми или совместимыми с функциональными особенностями органов. Надо отметить, что в указанном исследовании проводилось одноразовое введение наночастиц золота мышам внутривенно, были использованы смесь бипирамидальных 100 нм и сферических наночастиц 40

нм. Патоморфологические изменения органов изучали на световом микроскопе через 4 часа, сутки, 7 и 14 дней после введения. При исследовании количества наночастиц на электронном микроскопе в первые часы после введения (через 4 часа) в крови и моче наблюдали большое число наночастиц. Они быстро выводились из крови и накапливались в ретикулоэндотелиальной системе. Авторы указывают, что накопление их в печени может свидетельствовать о гепатобилиарном пути выделения наночастиц на последних сроках наблюдения. Большое количество наночастиц было обнаружено в почках: оно присутствовало весь период исследования с пиком на 7-й день после введения, единичные наночастицы найдены в мозге и в сердце.

Эти данные отличаются от результатов Г.С.Терентюк и соавт. [16], которые использовали наночастицы 50 нм и 160 нм, покрытые полиэтиленгликолем, причем мелкие наночастицы вызывали больше нарушений, чем частицы размерами 160 нм. Данные других авторов [10] указывают на их накопление только в почках.

Воздействие препаратов коллоидного золота на сердце *in vivo* практически мало изучено [3, 6, 11]. Большая часть данных о токсичности наночастиц золота получена в экспериментах *in vitro*.

В данной работе нами предпринято изучение возможных токсических проявлений в миокарде при длительном пероральном введении наночастиц золота сферической формы диаметром 2 нм экспериментальным животным взрослого возраста.

Материал и методы

В эксперименте использовали водный раствор наночастиц золота диаметром ≈ 2 нм. Матричный раствор содержал поверхностно-активное вещество сульфосукцинат натрия в концентрации 24 ммоль (НПК «Наномет»).

Исследование выполнено в МОНИКИ на белых годовалых нелинейных мышах (масса тела 20–25 г), что соответствует среднему возрасту человека 45–50 лет. Растворы наночастиц в конечных концентрациях 10 и 100 мкг/мл давали вместо питьевой воды, ежедневно регистрируя количество выпитой жидкости во всех группах. В контрольной группе использовали питьевую воду. Одна мышь в среднем выпивала за день 2,4 мл жидкости, что соответствует физиологической норме. Регулярно проводили осмотр животных, изучали их общее состояние (внешний вид, активность, аппетит, вес). Экспериментальных животных и животных контрольной группы забивали декапитацией на 7-е и 28-е сутки.

Ультраструктурные изменения клеток миокарда изучали методом электронной микроскопии на базе Российского национального исследовательского медицинского университета (кафедра морфологии)[3]. Миокард фиксировали в 2% рас-

творе глютарового альдегида, дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия и после обезвоживания в спиртах восходящей концентрации и ацетоне материал заливался в аралдит [9]. После прицельной заточки блоков получали ультратонкие срезы на ультрамикротоме Ultracut (Reichert-Jung), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца [14] и просматривали в электронном микроскопе HU-12A (Hitachi).

Результаты и обсуждение

На всех сроках эксперимента при пероральном введении различных концентраций наночастиц золота отмечались значительные изменения ультраструктуры всех компонентов миокарда: микроциркуляторного русла, интерстиция и собственно кардиомиоцитов.

На 7-е сутки после введения препарата в концентрации 10 мкг/мл наблюдалось увеличение поверхности контакта эндотелия с кровью, что выразилось в появлении большого количества выростов на люминальной поверхности эндотелиоцитов, многочисленных пиноцитозных везикулах и истончении участков цитоплазм в эндотелиальных клетках. Эти изменения являются косвенным указанием на увеличение интенсивности обмена между кровью и другими тканевыми компонентами миокарда. В эндотелии также можно было наблюдать скопление электронно-плотных частиц, которые, возможно, являются агрегатами наночастиц коллоидного золота, нарушающими непрерывность эндотелиальной выстилки капилляров. Описанные изменения носят мозаичный характер, так как встречались эндотелиоциты, характерные для интактного миокарда, что свидетельствует о гетерогенности функционального состояния эндотелия. Разные типы эндотелиоцитов часто образуют выстилку одного капилляра, при этом между подобными клетками сохраняются контакты с частично измененными десмосомами. Ядра эндотелиоцитов характеризовались извитыми контурами кардиолецеммы, содержали 1–2 ядрышка с умеренно выраженным гранулярным компонентом и отчетливую полосу маргинально конденсированного хроматина (рис.1). В хроматине обнаруживались конгломераты мелких частиц повышенной электронной плотности, которые, по-видимому, являлись наночастицами золота. Отмечалась отечность перикапиллярного пространства. В просвете капилляров были видны деформированные эритроциты, утратившие характерную для них форму, что, возможно, обусловлено нарушением структуры цитоскелета этих форменных элементов крови. Нередко определялся сладж эритроцитов (рис.2).

В стенках артериол и прекапиллярах выявлены ультраструктурные признаки активации трансэндотелиального транспорта: микроворсинки на поверхности эндотелиоцитов, пиноцитозные вези-

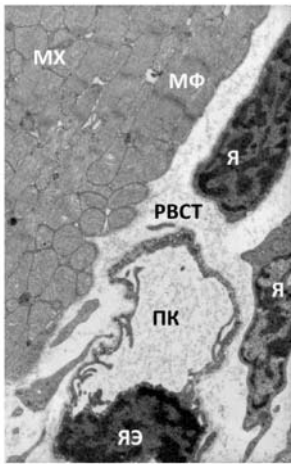


Рис.1. Ядрышки с умеренно выраженным гранулярным компонентом

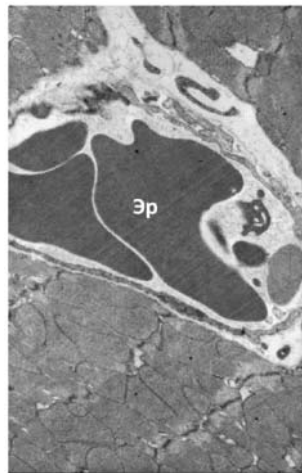


Рис.2. Деформированный эритроцит

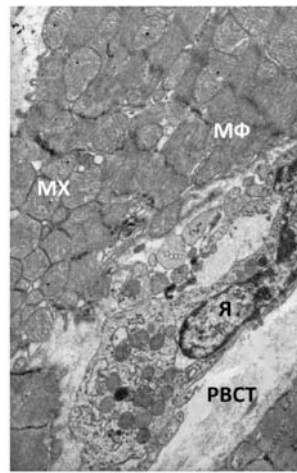


Рис.3. Миофибриллы с изгибами

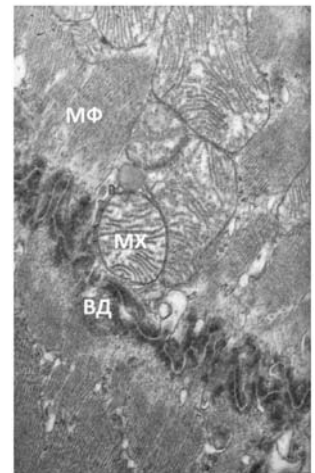


Рис.4. Вставочные диски

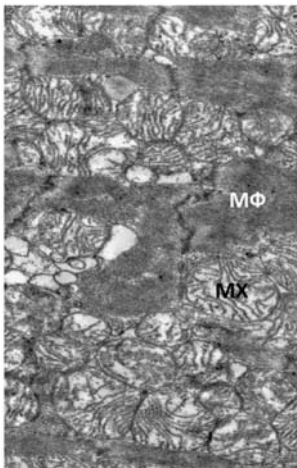


Рис.5. Вакуолизация митохондрий

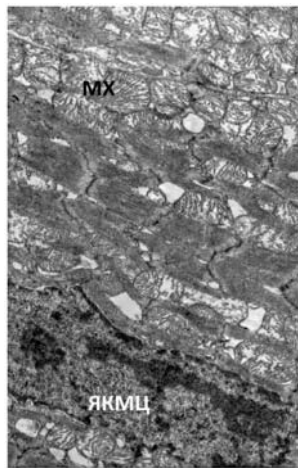


Рис.6. Отек митохондрий, разрезание их крист

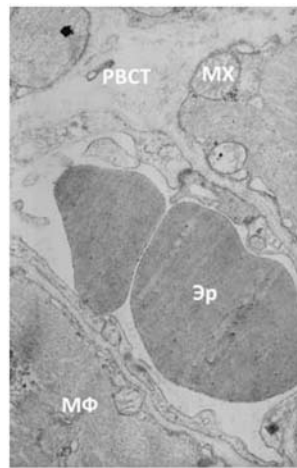


Рис.7. Сладж-синдром в микрососудах, отек рыхлой волокнистой соединительной ткани

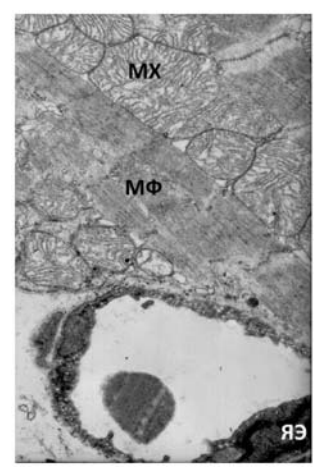


Рис.8. Нарушение структуры митохондрий

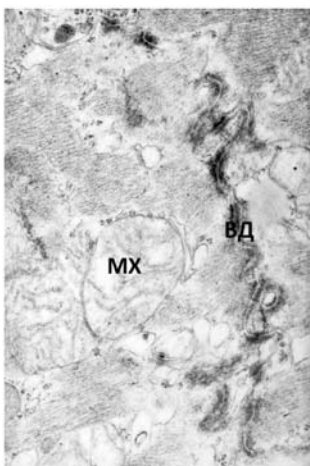


Рис.9. Признаки отека митохондрий

Обозначения в рисунках:
 ПК – просвет капилляров; МХ – митохондрии интактные; МФ – миофибриллы; Я – ядро клетки соединительной ткани; ЯЭ – ядро эндотелиоцита; ЯКМЦ – ядро кардиомиоцита; ВД – вставочные диски; Эр – эритроциты; RVST – рыхлая волокнистая соединительная ткань

кулы. В гладкомышечных клетках визуализировались актиновые и миозиновые филаменты. Эти данные служат указанием на повышенную функциональную активность лейомиоцитов.

Были отмечены изменения соединительной ткани по ходу сосудистого русла: увеличение межклеточного пространства, содержащего разволокненные, иногда фрагментированные пучки коллагеновых волокон и немногочисленные клеточные элементы. Среди них особого внимания заслуживают активированные макрофаги, которые содержат в цитоплазме многочисленные фагосомы, первичные и вторичные лизосомы. Наблюдались ультраструктурные признаки компенсаторной активации биосинтетической функции фибробластов, в цитоплазме которых были видны цистерны хорошо развитой гранулярной эндоплазматической сети и многочисленные рибосомы, что свидетельствует об активном белковом синтезе. Среди форменных элементов крови в интерстиции часто встречаются эозинофилы. Описанные признаки указывают на интенсивный интерстициальный отек, сопряженный с изменением проницаемости микрососудов. В кардиомиоцитах, которые в целом были сохранены, наблюдалось значительное расширение цистерн саркоплазматической сети. Митохондрии и миофибриллы практически не изменены. В некоторых участках кардиомиоцитов можно было наблюдать миофибриллы, которые имеют изгибы и отличную от других ориентацию. Отмечались незначительные изменения вставочных дисков, представленные расширением межмембранного пространства в области десмосом (рис.3 и 4).

На 28-е сутки после введения раствора наночастиц золота в концентрации 10 мкг/мл выявлялись изменения со стороны капиллярного русла. Капилляры спадались, резко уменьшая просвет. В эндотелиоцитах были видны дегенеративные изменения. Форменные элементы крови в капиллярах практически отсутствовали. Люминальная поверхность клеток сильно деформирована. Интерстициальный отек уменьшился по сравнению с ранними сроками введения препарата. В интерстиции виднелись разволокненные пучки коллагеновых волокон, идущих в разных направлениях.

Структура кардиомиоцитов характеризовалась деструктивными изменениями, сопровождавшимися вакуолизацией эндоплазматической сети и митохондрий (рис.5 и 6).

Истончение и частичное разрушение миофибрилл могут свидетельствовать о существенном нарушении процессов трофики миокарда.

На 7-е сутки у экспериментальных животных, получавших наночастицы золота в концентрации

100 мкг/мл, со стороны микроциркуляторного русла отмечались умеренная реактивность эндотелиальных клеток, практически нормальный просвет капилляров. В микрососудах выявлялся сладж-синдром (рис.7). Интерстициальный отек присутствовал, но в гораздо меньшей степени, чем при концентрации 10 мкг/мл на тех же сроках наблюдения. В кардиомиоцитах обнаруживались незначительные расширения цистерн саркоплазматической сети и изменения в митохондриях. Митохондрии были отечны, в них наблюдалась деструкция крист внутренней мембраны (рис.8 и 9).

На 28-е сутки наблюдения (концентрация 100 мкг/мл) интерстициальный отек практически отсутствовал, кровеносные капилляры не содержали форменных элементов крови, что может свидетельствовать о малом кровенаполнении данного участка сердца и возникновении ишемии миокарда. В эндотелиоцитах определялись очаги деструкции цитоплазмы, однако непрерывность эндотелия сохранена. В кардиомиоцитах были видны признаки деструктивных изменений митохондрий в виде их набухания, исчезновения внутренней мембраны, обнаружены расширение цистерн саркоплазматической сети, умеренно выраженный лизис миофиламентов в миофибриллах, а также разрушение контактов в составе вставочных дисков.

Заключение

Электронномикроскопические исследования миокарда после перорального введения коллоидного раствора наночастиц золота размером 2 нм показали наличие цитотоксического эффекта при введении наночастиц золота в концентрациях 10 и 100 мкг/мл, наиболее выраженные при 10 мкг/мл даже с минимальным сроком наблюдения – 7 суток. Ультраструктурные изменения были выявлены во всех тканевых компонентах миокарда. Обращают на себя внимание морфологические изменения стенки сосудов микроциркуляторного русла и, по-видимому, связанные с ними дисциркуляторные нарушения. Возможно, выявленный кардиотоксический эффект наночастиц золота обусловлен именно этим обстоятельством. В эндотелии капилляров были обнаружены дистрофические изменения в местах скопления наночастиц золота, увеличение количества микроворсинок эндотелия, резкая активация пиноцитоза. Все эти признаки указывают на усиление процессов трансэндотелиального транспорта, увеличение проницаемости капилляров и, как следствие, развитие перикапиллярного и интерстициального отека с последующими дистрофическими изменениями кардиомиоцитов. Сладж эритроцитов подтверждает наличие дисциркуляторных изменений в миокарде. Тем не

менее, изменения в цитоплазме и ядрах кардиомиоцитов могут быть обусловлены непосредственным воздействием наночастиц золота. Так, были выявлены скопления электронно-плотных частиц, которые, возможно, являются кластерами наночастиц золота в ядре и цитоплазме кардиомиоцитов.

Однако, выраженных грубых повреждений миокарда в виде очагов некроза не обнаружено ни на одном сроке наблюдения. Дистрофические изменения были более выражены к 28-м суткам эксперимента и затрагивали сократительный аппарат (лизис саркомеров миофибрилл) и мембранные структуры (деструкция крист митохондрий, цистерн саркоплазматической сети). Одними из возможных механизмов токсического эффекта непосредственно наночастиц золота могут быть активация процессов перекисного окисления липидов и образование свободных радикалов с последующей деструкцией биологических мембран и повреждением клеток.

Исследования с хроническим пероральным введением 2 нм наночастиц золота указывают на происходящие дегенеративные изменения миокарда, которые могут приводить к морфофункциональной несостоятельности работы сердца в целом. Это несколько контрастирует с выводами, приведенными в работе Е.В.Загайновой и соавт. [1].

Возможно, распределение наночастиц по организму зависит от многих факторов, включая их размер, способ и длительность введения, концентрацию, их покрытие и форму. Поэтому и существуют различные результаты, что говорит о необходимости дальнейшего расширенного изучения токсичности наночастиц с различными характеристиками. При планировании научных исследований необходимо также учесть все вышеперечисленные характеристики наночастиц и изучать их влияние на различный возраст (молодой и зрелый) экспериментальных животных.

Список литературы

1. Загайнова Е.В., Бузрова М.Л., Снопова Л.Б. Изучение биораспределения наночастиц золота в эксперименте на здоровых животных // Нанотехнол. в России. 2010. №5–6. С.409–416.
2. Измеров Н.Ф., Ткач А.В., Иванова Л.А. Нанотехнологии и наночастицы – состояние проблемы и задачи медицины труда // Мед. труда и промышл. экол. 2007. №8. С.1–5.
3. В.А.Липатова, В.М.Ботчей, Т.В.Писцова, В.А.Федосеев, А.В.Клочкова, В.К.Беляков, Е.П.Сухенко, В.Б.Суслов, И.А.Василенко, С.А.Румянцев, А.П.Эттингер, С.И.Куцев Ультратруктурные

признаки кардиотоксичности наночастиц золота в эксперименте in vivo Вестник РГМУ, Москва №3, с.59–63, 2013.

4. Петрицкая Е.Н., Абаева Л.Ф., Розаткин Д.А. Некоторые аспекты токсичности наночастиц серебра в эксперименте со взрослыми мышами при пероральном приеме коллоидных растворов // Нанотехника. 2013. №1. С.108–112.

5. Петрицкая Е.Н., Абаева Л.Ф., Розаткин Д.А. и др. К вопросу о токсичности наночастиц серебра при пероральном введении коллоидного раствора // Альманах клин. мед. 2011. №25. С.9–12.

6. Abdelhalim M.A. Exposure to gold nanoparticles produces cardiac tissue damage that depends on the size and duration of exposure // Lipids Health Dis. 2011. V.10. P.205.

7. Chithrani B.D., Ghazani A.A., Chan W.C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells // Nano Lett. 2006. V.6, No.4. P.662–668.

8. Connor E.E., Mwamuka J., Gole A. et al. Gold Nanoparticles Are Taken up by Human Cells But Do Not Cause Acute Cytotoxicity // Small. 2005. V.1, No.3. P.325–327.

9. Glauert A.M. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. Amsterdam: Elsevier, 1975. 207 p.

10. James W.D., Hirsch L.R., West J.L. et al. Application of INAA to the Build Up and Clearance of Gold Nanoshells in Clinical Studies in Mice // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2007. V.271, No.2. P.455–459.

11. Lasagna-Reeves C., Gonzalez-Romero D., Barria M.A. et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V.19, No.393(4). P.649–655.

12. Murphy C.J., Gole A.M., Stone J.W. et al. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging // Acc. Chem. Res. 2008. V.41, No.12. P.1721–173.

13. Pan Y., Neuss S., Leifert A. et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles // Small. 2007. V.3, No.11. P.1941–1949.

14. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. V.17, No.1. P.208–212.

15. Sopjani M., Fuller M., Lang F. Gold stimulates Ca²⁺ entry into and subsequent suicidal death of erythrocytes // Toxicology. 2008. V.28, No.244 (2–3). P.271–279.

16. Terentyuk G.S., Maslyakova G.N., Suleymanova L.V. et al. Circulation and Distribution of Gold Nanoparticles and Induced Alterations of Tissue Morphology at Intravenous Particle Delivery // J. Biophotonics. 2009. V.2, No.5. P.292–302.

17. Wang J. et al. Time dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles // Toxicology. 2008. V.254. P.82–90.