



УДК 616.379-008.64:57.08:577.29:615: 576.6; 576.33: 616-091.8572:616.716.8(571.5)

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВО ВНУТРЕННИХ ОРГАНАХ И ПЕРЕВИТОЙ ОПУХОЛИ ПЕЧЕНИ ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ ЗОЛОТЫХ НАНОСТЕРЖНЕЙ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ И ПЕРЕВИТОЙ ОПУХОЛЬЮ



А. Б. Бучарская, Г. С. Терентюк, Г. Н. Маслякова, О. В. Матвеева,
Н. А. Наволокин, Н. И. Дихт, Н. Г. Хлебцов¹, Б. Н. Хлебцов¹

Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского

E-mail: gmaslyakova@yandex.ru

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

E-mail: khlebtsov@ibppm.sgu.ru

В эксперименте изучали воздействие золотых наностержней на внутренние органы и перевитую опухоль печени при сочетанной патологии – моделированном аллоксановом диабете и перевитой опухоли печени при внутривенном введении. Проводилась оценка морфофункциональных изменений и биораспределения золота во внутренних органах и перевитой опухоли печени. В результате проведенного исследования было обнаружено, что однократное внутривенное введение золотых наностержней не вызывает значительных морфологических изменений во внутренних органах и перевитой опухоли у крыс с аллоксановым диабетом и при сочетанной патологии. Было отмечено значительное накопление золота в селезенке и печени у животных во всех экспериментальных группах.

Ключевые слова: золотые наностержни, аллоксановый диабет, перевитая опухоль печени.

Morphological Changes in the Internal Organs and Implanted Liver Tumor after Intravenous Injection of Gold Nanorods in Rats with Diabetes and Transplanted Tumor

А. В. Bucharskaya, G. S. Terentyuk, G. N. Maslyakova,
O. V. Matveeva, N. A. Navolokin, N. I. Diht,
N. G. Khlebtsov, B. N. Khlebtsov

The effects of gold nanorods on the internal organs and the transplanted liver tumor were studied in rats with simulated alloxan diabetes and transplanted liver tumors after intravenous administration. Assessed morphofunctional changes and biodistribution of gold in the internal organs and transplanted liver tumor. The study found that a single intravenous injection of gold nanorods does not cause significant morphological changes in the internal organs and transplanted tumors in rats with alloxan diabetes and transplanted tumor. There was a significant accumulation of gold in the spleen and liver of animals in all experimental groups.

Key words: gold nanorods, alloxan diabetes, transplanted liver tumor.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), сахарный диабет находится на четвертом месте среди причин, приводящих к преждевременной смертности.

Хотя связь между диабетом и возникновением онкологических заболеваний была обнаружена

более 100 лет назад, только современные проспективные эпидемиологические исследования, проведенные в нескольких странах, доказали повышенный риск развития рака у больных сахарным диабетом, в основном у пациентов с диабетом 2-го типа [1].

Наиболее часто при сахарном диабете опухоли локализируются в печени, поджелудочной железе, реже – в прямой кишке, эндометрии, молочной железе, почках [2–4].

Данные популяционных исследований и клинических испытаний показывают, что у больных сахарным диабетом наблюдается более высокий уровень смертности и рецидивов после установления диагноза рака. Достижение контрольных уровней глюкозы приводит к улучшению клинических исходов, таким образом, дальнейшая успешная противоопухолевая терапия зависит от содержания уровня глюкозы.

Значительное количество экспериментальных работ, посвященных изучению сочетанной патологии – сахарного диабета и опухолевого процесса, проведенных в 50–60-х гг. прошлого века, выявили наличие взаимного модифицирующего воздействия опухоли и гипергликемии при сахарном диабете [5, 6].

Недостаточная эффективность применяемых методов терапии злокачественных опухолей обуславливает необходимость поиска новых путей решения этой проблемы. Одним из таких направлений, сформировавшихся главным образом в течение последних десяти лет, является применение нанотехнологий.

Уникальные особенности наночастиц открывают широкие перспективы в создании новых лекарственных средств на основе нанолекарств, которые могут использоваться в терапии различных заболеваний, в том числе онкологических.



Существует огромное количество видов наночастиц, но одними из самых перспективных для биомедицинских применений являются золотые наночастицы благодаря своим значимым свойствам: биосовместимости, высокой реактивности поверхности, устойчивости к окислению и плазмонному резонансу [7].

Сегодня уже известны некоторые важные аспекты воздействия золотых наночастиц на клетки [8], которые могут использоваться при лечении сахарного диабета и опухолей. Известно, что оба заболевания характеризуются увеличением образования свободных радикалов за счет гипергликемии и эндогенной раковой интоксикации, которые могут быть снижены за счет использования наночастиц [9]. Следовательно, использование золотых наночастиц может стать эффективным терапевтическим агентом для регулирования и контроля окислительного стресса, что может в дальнейшем значительно улучшить качество жизни пациентов с сахарным диабетом и онкологическими заболеваниями. Однако использование новых материалов в медицине требует углубленного изучения с целью выяснения возможных побочных эффектов, поэтому необходимо изучить влияние золотых наностержней на организм со злокачественной опухолью на фоне сахарного диабета.

Цель исследования – изучить морфофункциональные изменения и биораспределение золота во внутренних органах и перевитой опухоли печени при внутривенном введении золотых наностержней у крыс с сочетанной патологией – сахарным диабетом и перевитой опухолью.

Материалы и методы

Работа выполнена на 48 самцах белых беспородных крыс массой 180–200 г. Организация работы соответствовала международным этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных, отражённым в законе о благополучии животных Конвенции Европейского союза и Европейской конвенции защиты позвоночных животных для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), в международных правилах Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies от 04.03.2002 г. и в приказе Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

В первой серии эксперимента крысы были распределены на три основные группы по 12 особей в каждой и группу контроля (12 крыс, которым внутривенно однократно вводилось 2 мл 0.9%-ного раствора NaCl).

В первой группе моделировали аллоксановый диабет путем внутривенного введения аллоксана моногидрата («Sigma», США) в дозе 100 мг/кг. Дозировка была рассчитана на основании предварительно проведенного эксперимента. Учитывая общеизвестную фазную динамику гликемии у лабораторных грызунов после введения аллоксана, выраженность проявления экспериментального сахарного диабета оценивали не ранее чем через 72 ч с момента моделирования этого состояния [10]. Определение уровня глюкозы в крови проводили глюкометром Accu-Chek Performa Roche (Швейцария) на 5, 10, 15 сут с момента введения аллоксана. На 15-е сут 6 крыс были выведены из эксперимента путем декапитации.

Во второй группе имплантировали подкожно в области лопатки по 0.5 мл 25%-ной опухолевой взвеси в растворе Хэнкса штамма альвеолярного рака печени – РС1. Штаммы перевиваемых опухолей получены из банка опухолевых штаммов ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. На 30-е сут 6 крыс были выведены из эксперимента путем декапитации.

В третьей группе через 15 сут после введения аллоксана перевивалась опухоль. Моделирование сахарного диабета и трансплантация опухоли осуществлялась аналогичными способами, описанными выше. На 30-е сут 6 крыс были выведены из эксперимента путем декапитации.

Вторая серия эксперимента проводилась на 15-е сут в первой группе и 30-е сут во второй и третьей группах. Всем оставшимся в эксперименте крысам внутривенно вводилось по 2 мл раствора золотых наностержней. Через сутки все животные выводились из эксперимента методом декапитации.

Синтез ПЕГ-покрытых золотых наностержней

В работе использовали следующие реактивы: нитрат серебра AgNO_3 (>99.9%, Aldrich, 20.913-9), цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ, 96%, Fluka, USA, № 52370), золотохлористоводородная кислота (HAuCl_4 , >99%, Aldrich, USA), изоскорбиновая кислота (AsA, >99%, Fluka, USA), боргидрид натрия (Sigma-Aldrich, USA), соляная кислота (ОСЧ, Вектон, Россия), поташ (ОСЧ, Реахим, Россия), полиэтиленгликоль-тиол (PEG-SH, $M_w = 5000$, Nektar, USA), вода Milli Q.

На первом этапе синтеза последовательно смешивали 1 мл 0.1 М цетилтриметиламмоний-бромид, 25 мкл 10 мМ HAuCl_4 и 100 мкл 10 мМ раствора боргидрида натрия. После добавления HAuCl_4 смесь меняет цвет с бесцветного на жел-



тый, после добавления боргидрида натрия цвет немедленно изменяется на бледно-коричневый, что свидетельствует об образовании золотых наночастиц диаметром 1–3 нм. Зародышевый раствор оставляли без перемешивания, не закрывая крышку, на 30–120 мин. Далее к 100 мл 0.1 М раствора СТАВ добавляли последовательно 2 мл 4 мМ раствора нитрата серебра, 5 мл 10 мМ раствора HAuCl_4 , 1 мл 100 мМ раствора аскорбиновой кислоты, 1 мл 1 М соляной кислоты, 1 мл золотых зародышей. Полученную суспензию выдерживали при 28 °С в течение 24 ч. В результате получали суспензию золотых СТАВ-покрытых наностержней с концентрацией золота около 80 мкг/мл и оптической плотностью 3.5–4 в 1 см кювете на длине волны плазмонного резонанса.

Полученную суспензию золотых наностержней центрифугировали 1 ч при 14000 об./мин. Осадок, содержащий наночастицы, растворяли в том же объеме воды. К 100 мл суспензии наночастиц добавляли 1 мл 0.2 М раствора поташа и 1 мл 1 мМ раствора PEG-SH. Суспензию выдерживали 12 ч при 28 °С и центрифугировали 1 ч при 14000 об./мин. Осадок растворяли в 100 мл воды. Процедуру центрифугирования-перерастворения повторяли 5 раз, после чего раствор концентрировали до концентрации золота 400 мкг/мл.

Геометрические параметры наностержней определяли по трансмиссионным электронно-микроскопическим (ТЭМ) изображениям, полученным на электронном микроскопе Libra-120 (Carl Zeiss, Germany) (рис. 1).

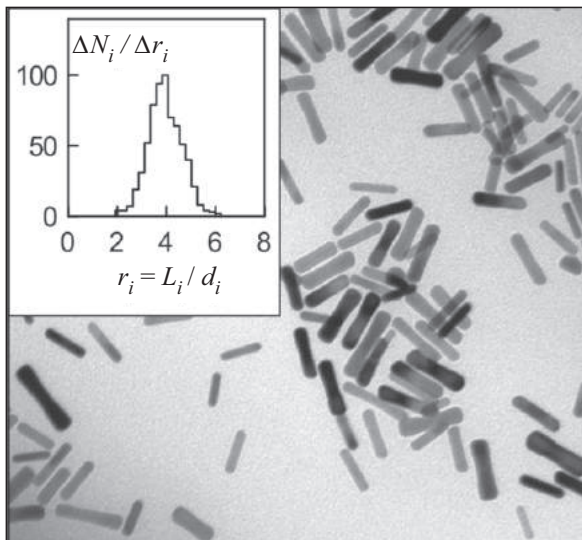


Рис.1. ТЭМ изображение золотых наностержней. На вставке показана гистограмма числового распределения частиц $\Delta N_i / \Delta r_i$ по осевым отношениям $r_i = L_i / d_i$ со средним значением $r = 4.03 \pm 0.7$ (y.e.)

Как видно, в среднем форма частиц соответствует цилиндрам с полусферическими концами, а вариации формы за счет более плоской формы концов и уменьшения диаметра в центре частицы для данного образца очень малы. Для ансамбля из примерно 500 частиц определялись длина L_i , диаметр d_i и осевое отношение $r_i = L_i / d_i$ каждой частицы. Средние значения длины и диаметра стержней равны $L = 41 \pm 8$ нм и $d = 10.2 \pm 2$ нм соответственно. На вставке приведена гистограмма числового распределения частиц $\Delta N_i / \Delta r_i$ по осевым отношениям r_i со средним значением $r = 4.03 \pm 0.7$.

На всех этапах выведения животных из эксперимента проводился забор тканей селезенки, печени, почек и опухоли для морфологического исследования и исследования биораспределения золота. Содержание золота в образцах биоткани (кусочки печени, селезенки, из центра и периферии опухоли массой 1 г) определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) на спектрофотометре Dual Atomizer Zeeman AA iCE 3500 (Thermo Scientific Inc., USA). Для калибровки спектрометра использовали раствор HAuCl_4 в 0.1М HCl или раствор коллоидного золота с известной концентрацией золота. Во втором случае коллоидные частицы растворялись в царской водке ($3\text{HCl} : 1\text{HNO}_3$). Обе калибровочные процедуры давали сходные результаты.

Гистологические срезы изготавливались по стандартной методике и окрашивались гематоксилином и эозином и реактивом Шиффа для выявления углеводов (ШИК-реакция).

Статистический анализ полученных данных проведен с использованием пакета прикладных компьютерных программ SPSS – 13.0. Полученные данные были представлены в виде средней арифметической и её стандартной ошибки ($M \pm m$). О достоверности межгрупповых различий судили по параметрическому критерию Стьюдента (t -тест) для количественных показателей с нормальным распределением, по непараметрическому критерию Манна–Уитни для количественных показателей с распределением, отличным от нормального. Проверка статистических гипотез осуществлялась при критическом уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты исследования

Первая серия эксперимента

В первой и третьей группах животных при введении аллоксана наблюдалось достоверное повышение уровня глюкозы в сыворотке крови:



через 5 дней – до 25.04 ± 2.64 ммоль/л, через 10 дней отмечалось небольшое снижение – до 12.34 ± 2.86 ммоль/л, через 15 дней уровень глюкозы

вновь поднимался до 18.39 ± 3.49 ммоль/л ($p < 0,05$), что значительно превышало контрольные значения (табл. 1).

Таблица 1

Уровень глюкозы в крови при аллоксановом диабете

Показатель	Контроль	Аллоксан внутривенно (100 мг/кг веса) ($M \pm m$)		
		Через 5 дней	Через 10 дней	Через 15 дней
Глюкоза, ммоль/л	3.78 ± 0.34	25.04 ± 2.64	12.43 ± 2.86	18.39 ± 3.49

У животных наблюдались клинические проявления сахарного диабета – полидипсия, полиурия, на 5-е сут шерсть животных становилась влажной, приобретала грязно-коричневый оттенок. Летальность на 5-е сут составила 8.3%.

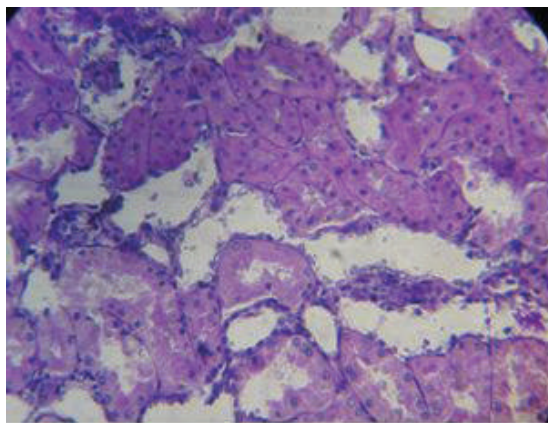
При анализе гистологических срезов крыс с моделированным сахарным диабетом на 15-е сут после введения аллоксана отмечались различной степени выраженности морфологические изменения по сравнению с контрольной группой животных.

В печени архитектоника строения сохранялась, в гепатоцитах развивалась различной степени выраженности углеводная дистрофия, обнаруживалось полнокровие в центральных венах и синусоидах. При проведении ШИК-реакции отмечали значительное снижение накопления гликогена в печени по сравнению с контролем (отсутствие положительной ШИК-реакции). Это связано с уменьшением тканевых запасов гликогена в печени при развитии сахарного диа-

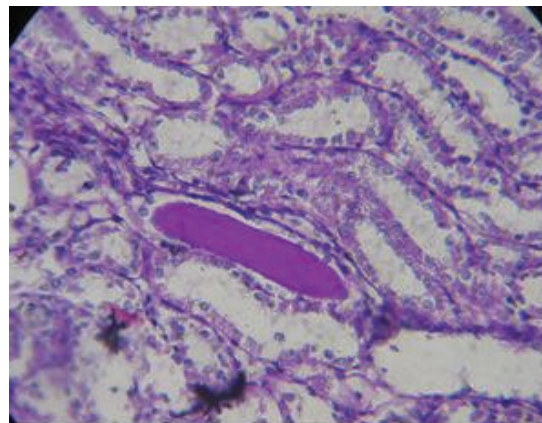
бета и повреждении вырабатывающих инсулин β -клеток островков поджелудочной железы.

В селезенке белая пульпа была представлена лимфатическими фолликулами без светлых центров, в красной пульпе располагались гранулы пигмента, отмечалось незначительное преобладание красной пульпы над белой.

Характерные структурно-функциональные изменения почек при диабете связаны с глюкозурией. В почках развивается углеводная дистрофия эпителия канальцев, отмечается некроз отдельных клеток. Наблюдается уменьшение просвета канальцев, увеличение размеров эпителиоцитов и кистозная трансформация канальцев. Выявляется гликогенная инфильтрация эпителия канальцев, главным образом в апикальной части цитоплазмы и базальной мембраны. В просвете канальцев отмечается ШИК-положительное содержимое, что отражает процесс усиленного синтеза гликогена в канальцевом эпителии при резорбции богатого глюкозой ультрафильтрата плазмы (рис. 2).



а



б

Рис. 2. Почка крысы с сахарным диабетом на 15-й день после введения аллоксана. Выраженная ШИК-положительная реакция в эпителии канальцев (а) и ШИК-положительное содержимое в просвете канальца (б). Окраска – ШИК-реакция. Увеличение $\times 400$

В клубочках отмечали неравномерно выраженное полнокровие, в некоторых случаях – утолщение капсулы Боумена–Шумлянского; в мелких артериолах – плазматическое пропи-

тывание (рис. 3), в лоханке отмечается атрофия уротелия.

В поджелудочной железе отмечали полнокровие, очаговый периваскулярный склероз,



панкреатические ацинусы тесно прилегают друг к другу. У животных с аллоксановым диабетом количество и размеры панкреати-

ческих островков уменьшено, при этом многие островки имеют признаки дегенерации (рис. 4).

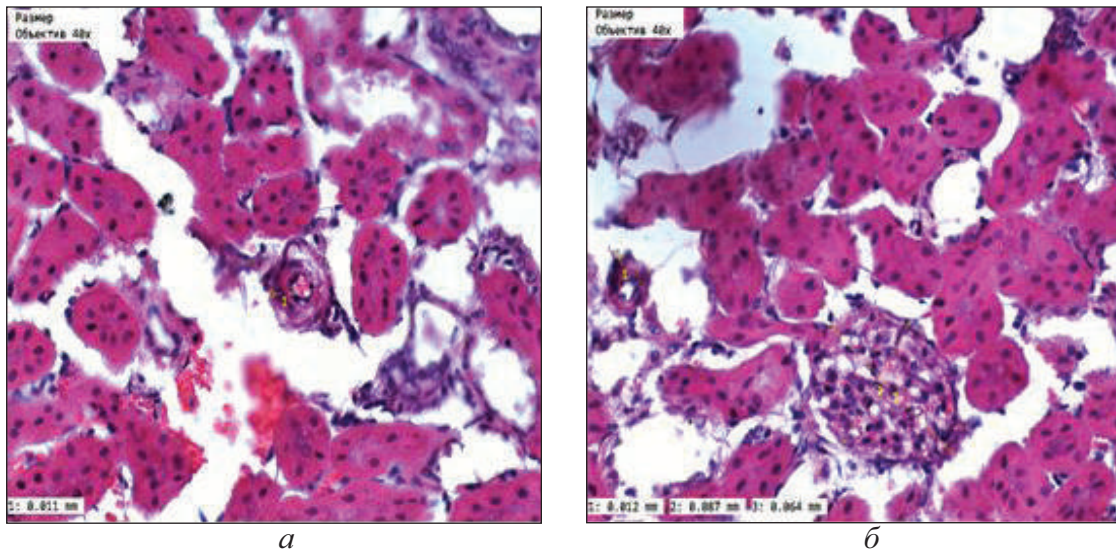


Рис. 3. Почка крысы с сахарным диабетом на 15-й день после введения аллоксана. Утолщение капсулы Боумена–Шумлянського (а), выраженное полнокровие в клубочках (б). Окраска – гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 400$

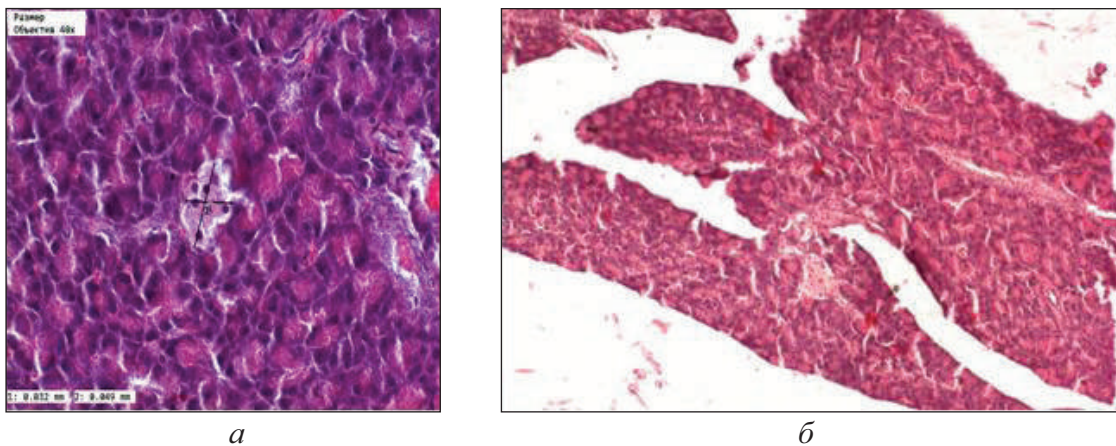


Рис. 4. Поджелудочная железа крыс с сахарным диабетом на 15-й день после введения аллоксана. Дегенерация панкреатических островков (а), полнокровие (б). Окраска – гематоксилин-эозином. Увеличение (а) – $\times 400$, (б) – $\times 200$

Во второй группе животных через месяц после трансплантации опухоли морфологические исследования внутренних органов показали отсутствие значительных структурных изменений. Поджелудочная железа сохранила нормальное гистологическое строение как ацинусов, так и островков Лангерганса. В паренхиматозных органах (печень, почки, миокард) были выражены признаки нарушения кровенаполнения, дистрофия клеток, в строме отмечался отёк. Данные морфологические изменения можно объяснить наличием интоксикационного воздействия на организм животных развивающейся опухоли.

Исследования в третьей группе животных с аллоксановым диабетом и трансплантированной опухолью печени показали, что трансплантация опухоли изменяет течение экспериментального сахарного диабета: через 10 дней после перевивки опухоли происходит нормализация уровня глюкозы в крови – до 5.7 ± 0.7 ммоль/л.

При морфологическом исследовании печени, поджелудочной железы и почек у животных с сахарным диабетом и трансплантированной опухолью отмечаются изменения, характерные для сахарного диабета. В печени отмечается более выраженная зернистая дистрофия гепатоцитов, вплоть до некроза отдельных клеток.



При проведении ШИК-реакции в печени животных с сахарным диабетом и трансплантированной опухолью отмечается выраженная ШИК-положительная реакция в виде гомоген-

ной зернистости в цитоплазме гепатоцитов, что свидетельствует об увеличенном накоплении гликогена в печени животных данной группы по сравнению с группой с сахарным диабетом (рис. 5).

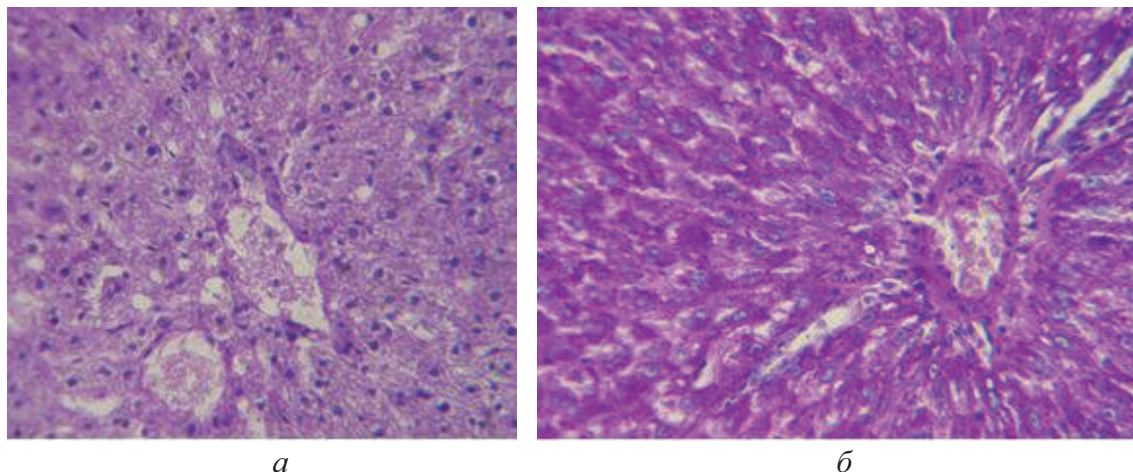


Рис. 5. Печень крысы с сахарным диабетом: *а* – отсутствие ШИК-реакции; печень крысы с сахарным диабетом и трансплантированной опухолью: *б* – окраска – ШИК-реакция. Увеличение $\times 400$

У животных данной группы было отмечено снижение темпов роста опухоли, через месяц после перевивки масса опухоли у животных с сахарным диабетом составила 17.6 ± 2.3 г, а в группе сравнения – 26.9 ± 3.1 г. При морфологическом исследовании опухоли животных данной

группы было отмечено увеличение площади некрозов (20% по сравнению с 12.5% в группе сравнения) и снижение митотической активности опухоли (12 на 1000 клеток по сравнению с 23 на 1000 клеток во второй опытной группе) (рис. 6).

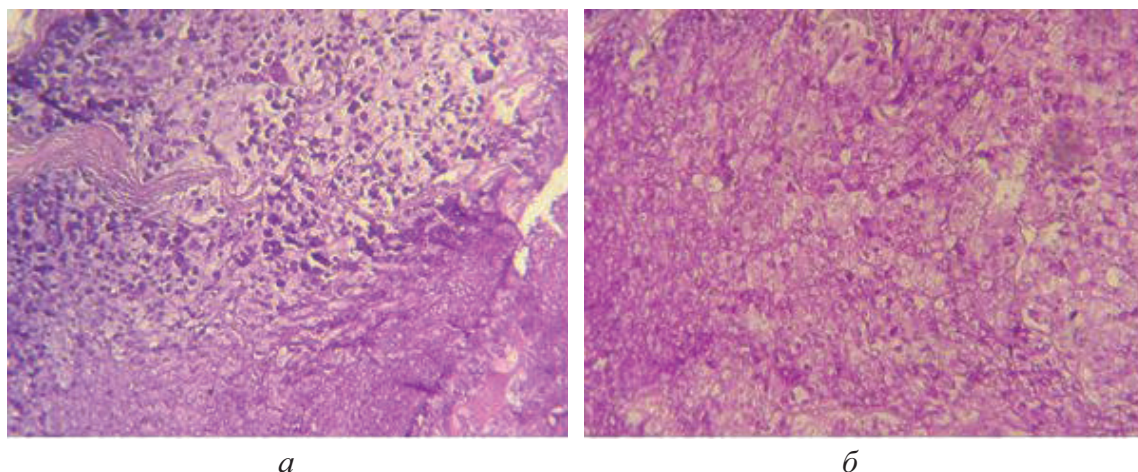


Рис. 6. Опухоль печени крысы из группы сравнения (*а*). Опухоль печени крысы с сахарным диабетом – увеличение площади некрозов (*б*). Окраска – ШИК-реакция. Увеличение $\times 200$

Вторая серия эксперимента

Через сутки после внутривенного введения золотых наностержней значительных морфологических изменений во внутренних органах и перевитой опухоли печени у крыс во всех экспериментальных группах не было обнаружено. При

количественном определении содержания золота во внутренних органах и перевитых опухолях в экспериментальных группах крыс на атомно-адсорбционном спектрофотометре были получены следующие результаты: наибольшее содержание золота было обнаружено в селезенке во всех опыт-



ных группах, накопление золота в печени было на порядок меньшим, наименьшее содержание

золота было обнаружено в опухолях животных первой и второй опытных групп (табл. 2).

Таблица 2

Содержание золота во внутренних органах и опухоли лабораторных животных после введения золотых наностержней, мкг/г сырого образца биоткани

Наименование биоткани	Сахарный диабет и опухоль	Перевитая опухоль	Сахарный диабет	Контроль
Селезенка	74.74±0.28	83.45±5.8	72.23±3.67	69.45±4.24
Опухоль центр	0.495±0.045	0.36±0.14	–	–
Опухоль периферия	0.315±0.135	0.405±0.112	–	–
Печень	3.84±1.39	6.36±0.31	5.84±0.94	4.32±0.65

Полученные результаты демонстрируют большее накопление золотых наночастиц в селезенке и печени крыс с перевитыми опухолями по сравнению с другими экспериментальными группами. Достоверных различий в накоплении золота в ткани опухоли печени в группе крыс с перевитой опухолью и в группе крыс с сахарным диабетом и перевитой опухолью не было выявлено.

Заключение

В поджелудочной железе при введении аллоксана развивается атрофия эндокринных островков, связанная с селективной деструкцией β-клеток. При введении аллоксана и развитии сахарного диабета происходит изменение сосудистой стенки в виде плазматического пропитывания, связанного с гипергликемией, как первый этап изменения сосудов, приводящего в дальнейшем к развитию диабетической микроангиопатии.

Наиболее выраженные морфологические изменения развиваются в почках у крыс с сахарным диабетом и характеризуются углеводной дистрофией эпителия канальцев, полнокровием клубочков и развитием плазматического пропитывания в стенках мелких артериол.

Трансплантация опухоли печени изменяет течение экспериментального сахарного диабета – в данной группе животных отмечается нормализация уровня глюкозы в крови, отмечается снижение темпов роста опухоли, увеличение площади некрозов и снижение митотической активности опухоли.

Внутривенное введение золотых наностержней через сутки приводит к значительному накоплению золота в селезенке и печени и не вызывает значительных морфологических изменений во внутренних органах и перевитой опухоли у крыс

в экспериментальных группах, что, вероятно, обусловлено коротким периодом наблюдения после введения наночастиц.

Список литературы

1. *Wideroff L., Gridley G., Chow W.-H., Linet M.* Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark // *J. Natl. Cancer Inst.* 1997. Vol. 89. P. 1360–1365.
2. *Lagiou P., Kuper H., Stuver S. O., Tzonou A., Trichopoulos D., Adami H.-O.* Role of diabetes mellitus in the etiology of hepatocellular carcinoma // *J. Natl. Cancer Inst.* 2000. Vol. 92. P. 1096–1099.
3. *Michels K. B., Solomon C. G., Hu F. B.* Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study // *Diabetes Care.* 2003. Vol. 26. P. 1752–1758.
4. *Weiderpass E., Ye W., Vainio H., Kaaks R., Adami H.-O.* Reduced risk of prostate cancer among patients with diabetes mellitus // *Intern. J. Cancer.* 2002. Vol. 102. P. 258–261.
5. *Goranson E. S., Botham F., Willms M.* Inhibition of Growth of Transplanted Hepatomas in Alloxanized Wistar Rats // *Cancer Res.* 1954. Vol. 14. P. 730–733.
6. *Garvie W. H. H.* The influence of alloxan diabetes on experimental cancer // *Br. J. Surg.* 1968. Vol. 22. P. 128–132.
7. *Guo R., Song Y., Wang G., Murray R. W.* Does core size matter in the kinetics of ligand exchanges of monolayer-protected Au clusters? // *J. Amer. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127. P. 2752–2757.
8. *Connor E. E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C. J., Wyatt M. D.* Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity // *Small.* 2005. Vol. 1. P. 325–327.
9. *BarathManiKanth S., Kalishwaralal K., Sriram M., Ram Kumar Pandian S.* Antioxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice // *J. Nanobiotechnology.* 2010. 8:16. doi:10.1186/1477-3155-8-16.
10. *Lenzen S.* The mechanisms of alloxan and streptozotocin diabetes // *Diabetologia.* 2008. Vol. 51. P. 216–226.