

ВЛИЯНИЕ ПОКРЫТИЯ НА ЭФФЕКТЫ ЗОЛОТЫХ НАНОСТЕРЖНЕЙ ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ У КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Дихт Н.И.¹, Пахомий С.С.¹, Бучарская А.Б.¹, Годаге П.П.², Наволокин Н.А.¹, Терентюк Г.С.¹, Маслякова Г.Н.¹, Хлебцов Б.Н.², Хлебцов Н.Г.³

¹ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, e-mail: allaalla_72@mail.ru;

²Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов;

³Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

Цель: оценить влияние покрытия золотых наностержней на морфологические изменения во внутренних органах при внутривенном введении у крыс с аллоксановым диабетом. 36 белых беспородных крыс-самцов были случайным образом разделены на 5 экспериментальных групп и 1 контрольную группу. 18 животным моделировали аллоксановый диабет, 2 группам здоровых животных и 2 группам животных с аллоксановым диабетом вводили однократно внутривенно золотые наностержни (ЗНС), покрытые полиэтиленгликолем (PEG) и полистиролсульфонатом (PSS), через сутки животных выводили из эксперимента. Проводили морфологические исследования с использованием стандартных методик окрашивания и исследование сыворотки крови на содержание малонового диальдегида и гидроперекисей липидов. При внутривенном введении PSS-покрытых ЗНС у здоровых крыс наблюдалось увеличение малонового диальдегида в сыворотке крови, во внутренних органах развивались дистрофические изменения паренхиматозных элементов и нарушения кровообращения в строме. В печени и почках крыс с аллоксановым диабетом происходили дистрофические и некротические изменения в паренхиме внутренних органов, отмечались отек и полнокровие стромы, пролиферация лимфоидных клеток. Наиболее выраженные морфологические изменения во внутренних органах и значительное увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов были обнаружены у крыс с диабетом при внутривенном введении покрытых полистиролсульфонатом ЗНС. Покрытые полиэтиленгликолем золотые наностержни показали наименьшую токсичность при внутривенном введении у животных с моделированным диабетом, что позволяет рекомендовать их использование в диабетологии.

Ключевые слова: диабет, золотые наностержни, покрытие, внутренние органы, перекисное окисление

THE COATING INFLUENCE ON THE EFFECTS OF GOLD NANORODS AT INTRAVENOUS ADMINISTRATION IN RATS WITH ALLOXAN DIABETES

Dikht N.I.¹, Pakhomy S.S.¹, Bucharskaya A.B.¹, Godage P.P.², Navolokin N.A.¹, Terentyuk G.S.¹, Maslyakova G.N.¹, Khlebtsov B.N.², Khlebtsov N.G.³

¹Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: allaalla_72@mail.ru;

²Derzhavin Tambov State University, Tambov;

³Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov

Objective: to assess the morphological changes in the internal organs during the intravenous administration of gold nanorods (GNR) with different coatings in healthy rats and rats with simulated alloxan diabetes. The gold nanorods coated with polyethylene glycol (PEG) and polystyrene sulfonate (PSS) were used in the investigation, the average length and diameter of which were 41 ± 8 nm and 10 ± 2 nm, respectively. 36 white outbred male rats were randomly divided into 5 experimental groups and a control group. The 18 animal models were alloxan diabetes, 2 groups of healthy animals and 2 groups of animals with alloxan diabetes, including intravenous gold nanorods coated with polyethylene glycol (PEG) and polystyrene sulfonate (PSS), and the animals were withdrawn from the experiment after 24 hours. Morphological studies are carried out using standard methods of staining and testing of blood serum for the content of malondialdehyde and lipid hydroperoxides. At intravenous administration of PSS-coated GNR in healthy rats an increase in serum malondialdehyde was observed, dystrophic changes in parenchymal elements and circulatory disorders in the stroma developed. In the liver and kidneys of rats with alloxan diabetes, dystrophic and necrotic changes in the parenchyma of the internal organs, edema and plethora of the stroma, and proliferation of lymphoid cells developed. The most pronounced morphological changes in the internal organs and a significant accumulation of lipid peroxidation products were found in the group of rats with alloxan diabetes after intravenous injection of PSS-coated GNR. Gold nanorods coated with polyethylene glycol showed the least toxicity after intravenous administration in animals with simulated diabetes, which allows us to recommend their use in diabetology.

Keywords: diabetes, gold nanorods, coating, internal organs, peroxidation

Несмотря на значительные усилия, направленные на профилактику и борьбу с диабетом и его осложнениями, согласно данным Международной диабетической ассоциации в настоящее время этим заболеванием страдают более 463 миллионов человек в мире, диабет является седьмой по значимости причиной смертности [1]. Длительное воздействие хронической гипергликемии без надлежащей терапии может приводить к различным сосудистым осложнениям и является основной причиной заболеваемости и смертности у больных диабетом. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, в 2040 г. заболеваемость диабетом может составить около 642 миллионов человек [2]. Это обуславливает необходимость поиска новых терапевтических стратегий для лечения диабета, одним из перспективных направлений является применение нанотехнологий. Золотые наночастицы в связи с их низкой токсичностью и наличием антиоксидантных свойств [3] являются перспективными агентами для направленной доставки гипогликемических препаратов в диабетологии [4, 5]. Значительное влияние на эффекты наночастиц *in vivo* может оказывать характер покрытия наночастиц [6, 7], особенно в условиях развития в организме патологических процессов.

Цель исследования: оценить влияние покрытия золотых наностержней на морфологические изменения во внутренних органах при внутривенном введении у крыс с аллоксановым диабетом.

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование на лабораторных животных было выполнено на базе ЦКП СГМУ им. В.И. Разумовского. Белым беспородным крысам-самцам внутривенно вводили золотые наностержни (ЗНС) (концентрация золота 400 мкг/мл), покрытые полиэтиленгликолем (PEG) и полистиролсульфонатом (PSS). Синтез и вычисление параметров ЗНС проводили в лаборатории нанобиотехнологии и в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН (г. Саратов). Определение длины и диаметра ЗНС осуществляли по трансмиссионным электронно-микроскопическим (ТЭМ) изображениям микроскопа Libra-120 (Carl Zeiss, Germany). Средние размеры ЗНС составили: длина 41 ± 8 нм и диаметр 10 ± 2 нм.

При исследовании на лабораторных животных учитывали требования положений Европейской конвенции защиты позвоночных животных для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), рекомендации комитета по этике ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава РФ (протокол № 6 от 06.02.2018 г.).

Крысы случайным образом были распределены на 6 групп – 1 контрольная и 5 опытных. Контрольная группа была представлена интактными животными. Животным первой и второй опытных групп внутривенно вводили по 1 мл ЗНС с покрытием PEG и PSS соответственно. Крысам остальных опытных групп моделировали диабет посредством

внутрибрюшинного введения аллоксана моногидрата (Sigma, США) из расчета дозы 100 мг/кг. Глюкометром Accu-Chek Performa Roche (Швейцария) измеряли концентрацию уровня глюкозы в крови. Крысам четвертой и пятой опытных групп на 15-е сутки после формирования аллоксанового диабета внутривенно вводили ЗНС, покрытые PEG и PSS соответственно. Через сутки после внутривенного введения животные всех групп выводились из опыта методом декапитации, у них забирали сыворотку крови и образцы внутренних органов для морфологического исследования.

Перекисное окисление липидов оценивали на спектрофлуориметре RF-5301 PC (Shimadzu Corporation, Япония) по изменению показателей концентрации в сыворотке крови промежуточных продуктов – малонового диальдегида (МДА) и гидроперекисей липидов (ГПЛ).

При морфологическом исследовании использовали стандартный протокол приготовления материала. Фрагменты печени, почек и селезенки фиксировали в растворе забуференного 10%-ного формалина, помещали в спиртовую проводку и после заливки в парафин окрашивали гематоксилином и эозином. Наличие в тканях гликогена определяли с помощью окрашивания препаратов реактивом Шиффа (ШИК-реакция). Морфометрические исследования проводили с использованием системы анализа цифровых изображений Микровизора медицинского (μ Vizo-103 ЛОМО).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистических программ SSPS-13.0. Проверку нормальности распределения значений в выборке осуществляли с помощью теста Колмогорова–Смирнова. В случае нормального распределения определяли среднее арифметическое и стандартную ошибку, различия между группами вычисляли с использованием критерия Крамера–Уэлча. Если распределение отличалось от нормального, рассчитывали медиану, квартили и достоверность различий (p) с применением непараметрического критерия Манна–Уитни.

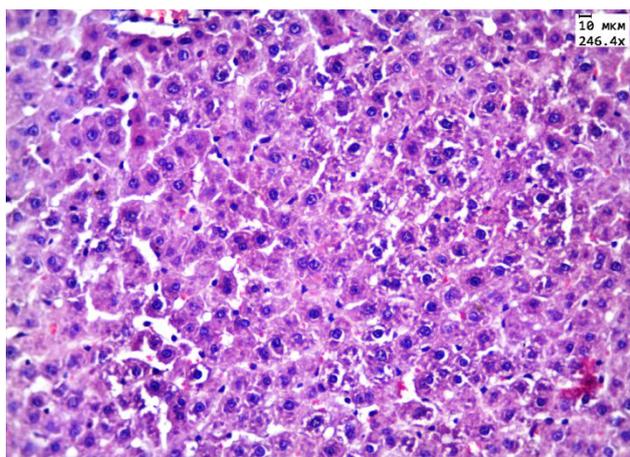
Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что при однократном внутривенном введении ЗНС с различным покрытием в органах у здоровых крыс развиваются дистрофические изменения паренхиматозных элементов и нарушения кровообращения в строме (отек и полнокровие), более выраженные в группе с внутривенным введением PSS-покрытых ЗНС. При морфологическом исследовании почек в корковом веществе на фоне полнокровия капилляров было обнаружено незначительное расширение клубочков. Канальцы имели округлую или овальную форму, при внутривенном введении PSS-покрытых ЗНС в эпителиальных клетках развивалась белковая дистрофия. Просвет большинства канальцев имел суженный вид вследствие увеличения высоты эпителия до $17,4 \pm 0,8$ мкм (при значениях

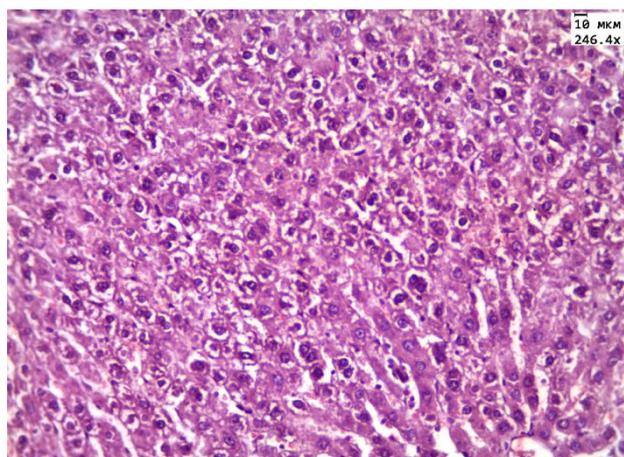
в контрольной группе $15,3 \pm 1,3$ мкм). В печени гистоархитектоника органа была сохранена, отмечались умеренно выраженное венозное полнокровие органа и при введении PSS-покрытых ЗНС – дистрофия гепатоцитов незначительной степени выраженности. В селезенке красная пульпа преобладала над белой пульпой, граница различалась отчетливо, лимфоидные фолликулы не имели светлых центров.

При биохимическом исследовании продуктов перекисного окисления в сыворотке крови липидов изменения были обнаружены только в группе введения ЗНС, покрытых PSS: концентрация малонового диальдегида превысила показатели контрольной группы в 3 раза и составила 1,6 [1,27; 1,82].

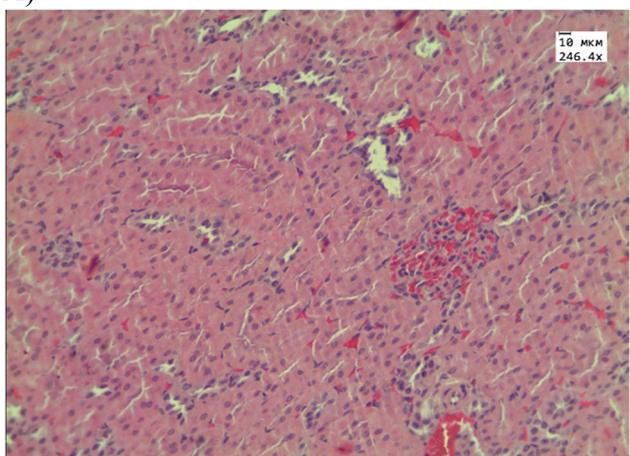
Введение аллоксана сопровождалось появлением у животных полидипсии, полиурии, в сыворотке крови на 15-е сутки после введения аллоксана отмечалось повышение уровня глюкозы в 3 раза по сравнению с группой контроля – до 18,5 ммоль/л. Летальность животных в данных группах на 5-е сутки составила 8,3%. При морфологическом исследовании в группах с аллоксановым диабетом в почках и печени обнаружены признаки, характерные для повреждения паренхимы органа при гипергликемии (рис. 1, А, В).



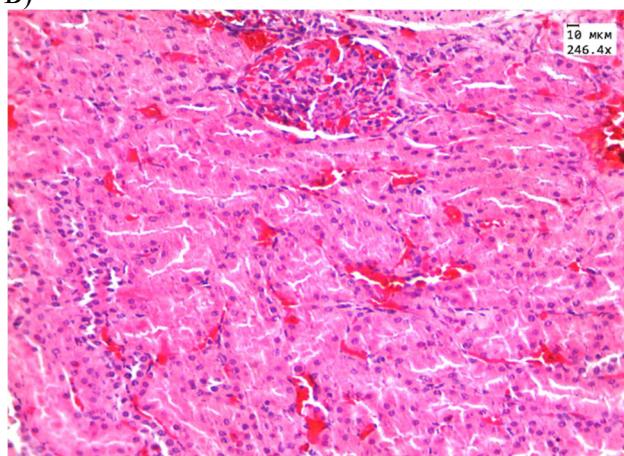
А)



Б)



В)



Г)

Рис. 1. Печень в группе животных с диабетом: А) при введении ЗНС, покрытых PEG; Б) при введении ЗНС, покрытых PSS. Почки в группе животных с диабетом: В) при введении ЗНС, покрытых PEG; Г) при введении ЗНС, покрытых PSS. Гематоксилин-эозин. Ув. x246,4

В почках наблюдались признаки нарушения кровообращения в виде отека стромы, умеренного полнокровия сосудов и наличия плазматического пропитывания в стенках мелких артериол. В корковом веществе в клубочках отмечалось увеличение капсулы Шумлянско-Боумана за счет отека. При морфометрическом исследовании обнаружено увеличение площади клубочков на 25% по сравнению с показателями в контрольной группе до $9,3 \pm 0,4$ мм² за счет умеренного полнокровия капилляров. Просвет извитых канальцев был сужен, эпителий находился в состоянии умеренно выраженной дистрофии. При морфометрическом исследовании обнаружено увеличение высоты эпителия извитых канальцев до $19,5 \pm 0,8$ мкм (в контроле $15,3 \pm 1,3$ мкм). При окрашивании реактивом Шиффа в цитоплазме эпителия и в просвете канальцев отмечались ШИК-положительные включения – гранулы гликогена. При морфологическом исследовании печени балочное строение было сохранено, наблюдалось умеренно выраженное полнокровие центральных вен и синусоидов. В пятой опытной группе с введением ЗНС, покрытых PSS, в половине наблюдений в корковом веществе почек были обнаружены очаговые лимфоидные инфильтраты. В чашечно-лоханочной системе во всех случаях обнаружены атрофические изменения уротелия. В гепатоцитах отмечалась дистрофия различной степени выраженности, имелись участки фокального некроза (рис. 1, Б).

При окрашивании реактивом Шиффа в цитоплазме гепатоцитов регистрировалось снижение уровня гликогена, что вероятнее всего связано со снижением его концентрации в тканях на фоне моделированного аллоксанового диабета. При морфометрическом исследовании печени определяли количество гепатоцитов с дистрофическими изменениями в цитоплазме и в состоянии некроза, подсчитывали число непаренхиматозных элементов печени (НПЭ) и двуядерных гепатоцитов. В качестве НПЭ печени учитывали лимфоциты, клетки Купфера и клетки Ито. Результаты морфометрического исследования представлены в таблице 1.

Во всех опытных группах с моделированным аллоксановым диабетом обнаружены признаки повреждения паренхимы печени, проявляющиеся в виде значительного повышения числа гепатоцитов, находящихся в состоянии некроза, – до 49 [31;57], что в 3 раза превышает значение показателя в контрольной группе. Степень выраженности некробиотических процессов в паренхиме печени оценивали с использованием коэффициента нормализации

паренхимы (КНП). КНП определяли как отношение числа гепатоцитов с дистрофическими изменениями к гепатоцитам в состоянии некроза на поле зрения (x774).

Во всех опытных группах с моделированным аллоксановым диабетом установлено достоверное снижение КНП по сравнению с группой контроля. Минимальные значения КНП – 0,7 – были получены в группе моделированного аллоксанового диабета с введением ЗНС, покрытых PSS.

Таблица 1

Результаты морфометрических исследований в печени

Группы наблюдения	Морфометрические показатели в поле зрения				
	Количество гепатоцитов с дистрофическими изменениями	Количество гепатоцитов в состоянии некроза	КНП	Количество НПЭ печени	Количество двуядерных гепатоцитов
Контрольная	39 [33;43]	15 [13;19]	2,6	7[5;8]	5 [3;6]
ЗНС (PEG)	43 [37;47]	17 [13;19]	2,5	4[3;5]	5 [3;7]
ЗНС (PSS)	45 [39;48]	19 [14;21]	2,3	5[3;7]	4 [3;6]
Диабет	41 [40;59]	49 [31;57]*	0,83*	13[10;17]*	1 [1;2]*
Диабет + ЗНС (PEG)	32 [25;35]	37 [33;39]*	0,86*	21[18;24]*	1 [0;2]*
Диабет + ЗНС (PSS)	35 [27;42]*	50 [36;59]*	0,7*	22[13;25]*	2 [1;3]*

*– $p < 0,05$ достоверность отличия с контрольной группой

Воздействие на макрофагальную систему печени оценивали по результатам подсчета числа НПЭ – лимфоцитов, резидентных макрофагов (клеток Купфера и Ито) в поле зрения (x774). У животных с моделированным аллоксановым диабетом введение ЗНС, покрытых PEG и PSS, сопровождалось увеличением числа НПЭ печени до 21 [18;24] и 22 [13;25] соответственно, что в 3 раза превышало показатели в контрольной группе.

Для оценки выраженности пролиферативных процессов подсчитывали количество двуядерных гепатоцитов в поле зрения (x774). Во всех опытных группах с моделированным диабетом было установлено уменьшение в 5 раз количества двуядерных гепатоцитов по сравнению с группой контроля.

В группах с моделированным диабетом в селезенке строма органа имела нормальное строение, красная пульпа преобладала над белой, граница между ними различалась

отчетливо. Лимфоидные фолликулы имели обычные размеры, округлую или овальную форму и были представлены скоплениями Т- и В-лимфоцитов, плазмочитами и макрофагами, без светлых центров размножения.

В сыворотке крови крыс с моделированным аллоксановым диабетом во всех опытных группах происходило увеличение количества МДА и ГПЛ по сравнению с группой контроля (табл. 2). В опытной группе с моделированным аллоксановым диабетом без введения ЗНС наблюдалось увеличение концентрации МДА до 0,97 [0,64; 1,24] и ГПЛ до 3,1 [1,89; 3,3].

Таблица 2

Содержание МДА и ГПЛ в сыворотке крови

Группы наблюдения	МДА, мкмоль/л	ГПЛ, ед/мл
Контрольная	0,53 [0,48; 0,71]	0,93 [0,78; 1,25]
ЗНС (PEG)	0,52 [0,48; 0,58]	0,82 [0,68; 0,98]
ЗНС (PSS)	1,6 [1,27; 1,82]*	1,5 [1,15; 1,82]
Диабет	0,97 [0,64; 1,24]*	3,1 [1,89; 3,3]*
Диабет + ЗНС (PEG)	1,39 [0,79; 2,07]*	3,65 [3,48; 4,2]*
Диабет + ЗНС (PSS)	2,5 [2,3; 2,75]***	3,77 [3,46; 4,12]**

*– достоверность отличия от контрольной группы ($p < 0,05$), ** – от группы с диабетом ($p < 0,05$)

Внутривенное введение ЗНС сопровождалось еще более значимым накоплением продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови. Максимальное повышение уровня МДА до 2,5 [2,3; 2,75] и ГПЛ до 3,77 [3,46; 4,12] наблюдалось в опытной группе крыс с введением ЗНС, покрытых PSS. Следует отметить, что внутривенное введение ЗНС, покрытых PEG, крысам с моделированным аллоксановым диабетом, несмотря на повышение титра МДА и ГПЛ, не сопровождалось развитием достоверных изменений по сравнению с группой животных с аллоксановым диабетом.

Таким образом, внутривенное введение ЗНС с покрытием PEG и PSS лабораторных крыс с моделированным аллоксановым диабетом сопровождалось появлением морфологических изменений в органах (повреждением паренхимы вплоть до развития участков некроза, отеком, полнокровием стромы, пролиферацией лимфоидных клеток и макрофагов) и накоплением в крови продуктов перекисного окисления липидов (МДА и ГПЛ). Наиболее выраженные изменения были обнаружены нами в опытной группе введения ЗНС, покрытых PSS. Полученные данные о влиянии покрытия при воздействии ЗНС на

морфологию внутренних органов согласуются с результатами работ ряда авторов [6, 7] и ранее выполненных нами исследований [8, 9].

Заключение

Проведенные исследования показали, что в печени и почках крыс всех опытных групп с моделированным аллоксановым диабетом развивались дистрофические и некротические изменения в паренхиме, отек и полнокровие стромы, пролиферация лимфоидных клеток и макрофагов. Наиболее выраженные морфологические изменения и наибольшее накопление продуктов липопероксидации были обнаружены в опытной группе с введением ЗНС, покрытых PSS. Полученные результаты вероятнее всего связаны с наличием отрицательного заряда у полистиролсульфонатной оболочки ЗНС. Внутривенное введение ЗНС, покрытых полиэтиленгликолем, не вызывало значительных морфологических изменений во внутренних органах у животных с аллоксановым диабетом, что позволяет рекомендовать их использование в исследованиях на животных с моделированными патологическими процессами.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с настоящей статьей.

Исследование проведено в рамках реализации государственного задания Минздрава России.

Список литературы

1. IDF DIABETES ATLAS. Ninth edition. 2019. [Электронный ресурс]. URL: https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/2019/IDF_Atlas_9th_Edition_2019.pdf (дата обращения: 11.11.2019).
2. Всемирная организация здравоохранения. Информационный бюллетень о диабете. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (дата обращения: 11.11.2019).
3. Khlebtsov N., Bogatyrev V., Dykman L., Khlebtsov B., Staroverov S., Shirokov A., Matora L., Khanadeev V., Pylaev T., Tsyganova N., Terentyuk G. Analytical and theranostic applications of gold nanoparticles and multifunctional nanocomposites. *Theranostics*. 2013. Vol.3. P.167-180.
4. Ng L.C., Gupta M. Transdermal drug delivery systems in diabetes management: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019. DOI: 10.1016/j.ajps.2019.04.006.
5. Venkatachalam M., Govindaraju K., Sadiq A. M., Tamilselvan S., Kumar V G., Singaravelu G. Functionalization of gold nanoparticles as antidiabetic nanomaterial. *Spectrochim Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013. vol. 116. P. 331-338.

6. Yah C. S. The toxicity of gold nanoparticles in relation to their physicochemical properties. *Biomed. Res.* 2013. Vol. 24. P. 400–413.
7. Fratoddi I., Venditti I., Cametti C., Russo, M.V. How toxic are gold nanoparticles? The State-of-the-Art. *Nano Res.* 2015. Vol. 8. P. 1771–1799.
8. Маслякова Г.Н., Пахомий С.С., Бучарская А.Б., Злобина О.В., Наволокин Н.А., Понукалин А.Н., Хлебцов Н.Г., Хлебцов Б.Н., Богатырев В.А. Морфологические изменения в органах лабораторных животных при длительном пероральном введении золотых наночастиц. // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9. № 2. С. 208-213.
9. Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Afanasyeva G.A., Terentyuk G.S., Navolokin N.A., Zlobina O.V., Chumakov D.S., Bashkatov A.N., Genina E.A., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V., Khlebtsov B.N. The morpho-functional assessment of plasmonic photothermal therapy effects on transplanted liver tumor. *Journal of Innovative Optical Health Sciences.* 2015. V. 8. № 3. P. 1541004.