

УДК: 576.31.087.1:591.463.2:549.731.31-148-022.532]:57.084.1

**МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕННИКОВ КРЫС ПОСЛЕ
ОДНОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ СУСПЕНЗИИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ
МАГНЕТИТА**

И.В. МИЛЬТО, И.В. СУХОДОЛО, В.В. ИВАНОВА

*ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Московский тракт, д. 2, Томск, 634050, Россия,
e-mail: milto_bio@mail.ru*

Аннотация. Для активного внедрения диагностических и терапевтических агентов на основе наноразмерных частиц магнетита требуется всесторонняя оценка их влияния на организм человека, особенно в отдаленные сроки. В работе изучена структура и дана морфометрическая характеристика семенников половозрелых крыс с 1 по 120 сутки после однократного внутривенного введения модифицированных хитозаном (магнитные наносферы) и липидами (магнитолипосомы) наноразмерных частиц магнетита. Введение суспензий немодифицированных и модифицированных хитозаном и липидами наноразмерных частиц магнетита не вызывает альтерации sustentocytov, spermatogenic cells and interstitial endocrinocytes, однако приводит к развитию обратимых гемодинамических изменений в семенниках. Однократное внутривенное введение магнитных наносфер и магнитолипосом не влияет на индекс сперматогенеза крыс, однако вызывает изменение диаметра извитых семенных канальцев в исследуемые сроки. С помощью гистохимической реакции Перлса в интерстициальной соединительной ткани семенников выявлены клетки, которые поглощают и накапливают наночастицы магнетита. Изучаемые модифицированные наноразмерные частицы магнетита не проникают через гематотестикулярный барьер крыс в исследуемые сроки. Поверхностная модификация наночастиц магнетита влияет на динамику количества Перлс-позитивных клеток в единице площади семенника крыс.

Ключевые слова: наночастицы магнетита, магнитные наносферы, магнитолипосомы, семенники.

**THE MORPHOMETRIC DESCRIPTION OF RAT TESTIS STRUCTURE AFTER SINGLE
INJECTION OF MODIFIED MAGNETITE NANOPARTICLES**

I.V. MILTO, I.V. SUKHODOLO, V.V. IVANOVA

*The Siberian State Medical University, Moskovskiy trakt, 2, Tomsk, 634050, Russia,
e-mail: milto_bio@mail.ru*

Abstract. Active introduction of diagnostic and therapeutic agents based on magnetite nanoparticles requires a comprehensive assessment of their effect on the human body, especially in the long term. We have studied the structure and morphometric characteristics of mature rat testes from 1 to 120 days after single intravenous administration magnetite nanoparticles modified by chitosan (magnetic nanospheres) and lipids (magnetoliposomes). The introduction of suspensions of unmodified and modified with chitosan and lipid magnetite nanoparticles does not cause alteration of the sustentocytes, spermatogenic cells and interstitial endocrinocytes, but leads to the development of reversible hemodynamic changes in the testes. A single intravenous injection of magnetic nanospheres and magnetoliposomes does not affect the spermatogenic index in rats, but causes a change in the diameter of the convoluted seminiferous tubules during examination. There were identified cells that absorb and accumulate magnetite nanoparticles in the interstitial connective tissue of the testes, using histochemical Perls reaction. The studied modified magnetite nanoparticles do not penetrate the blood-testis barrier of rats during examination. The surface modification of magnetite nanoparticles affects the dynamics of the number of Perls-positive cells per unit area of rat testis.

Key words: nanomagnetite, magnetic nanospheres, magnetoliposomes, testes.

Актуальность: в последние десятилетия стремительно расширяется область применения магнитных наноразмерных материалов, в том числе в медицине. Разрабатываются композиты на основе наноразмерных частиц оксида железа для целевой доставки препаратов, управляемой локальной гипертермии, в качестве контраста при различных методах визуализации [2, 9]. Для преодоления негативных биологических эффектов *наноразмерных частиц магнетита* (НЧМ) применяют их поверхностную модификацию [1, 5]. Для активного внедрения диагностических и терапевтических агентов на основе НЧМ требуется всесторонняя оценка их влияния на организм человека, особенно в отдаленные сроки. Большинство исследований биологических эффектов НЧМ на организм посвящено характеристике морфофунк-

ционального состояния органов с развитой системой мононуклеарных фагоцитов [10], тогда как влияние НЧМ на органы репродуктивной системы и сперматогенез практически не изучены [8, 10]. Поскольку распространенность идиопатического мужского бесплодия неуклонно растет, изучение влияния наноматериалов на органы репродуктивной системы представляется важной задачей [10].

Цель исследования – дать морфометрическую характеристику семенников крыс после однократного внутривенного введения суспензии модифицированных хитозаном и липидами наноразмерных частиц магнетита.

Материалы и методы исследования. Используемые в работе НЧМ получены механохимическим способом в Отделе структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН (г. Томск) и представляют собой сферические частицы со средним диаметром 7 нм. Суспензию немодифицированных НЧМ готовили в водно-солевом стабилизирующем растворе, содержащем хлорид натрия, цитрат натрия (РЕАХИМ, Россия) и динатриевую соль 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфониевой кислоты (*AppliChem GmbH*, Германия). Магнитолипосомы получали совместной экструзией суспензии немодифицированных НЧМ и эмульсии липидов (8 мг липидов/мл) через поликарбонатные фильтры (*Sartorius*, Германия) с диаметром пор 100 нм. Модификацию наночастиц хитозаном осуществляли сорбционным способом, смешивая суспензию немодифицированных НЧМ и раствор хитозана (1 г хитозана/л) с последующей сонификацией и фильтрованием. Водородный показатель всех суспензий составил 7,4. Концентрацию НЧМ в суспензиях устанавливали по концентрации атомарного железа рентгено-флуоресцентным методом (спектрометр *Quant'X, Thermo Scientific*, Швейцария). Распределение в суспензиях частиц и их агломератов по размерам определяли методом динамического светорассеяния (*Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments*, Великобритания). Структуру частиц в суспензиях изучали при помощи трансмиссионного электронного микроскопа (*JEM-100 CX II, JEOL*, Япония).

Исследование проводили на 168 беспородных половозрелых самцах крыс (4 мес., масса 150±20 г), которые были разделены на группы: 1-я группа (24 крысы) – интактные; 2-я группа (24 крысы) – однократное введение стабилизирующего раствора (2 мл); 3-я группа (40 крыс) – однократное введение суспензии немодифицированных НЧМ (0,14 г (Fe_3O_4)/кг массы тела, 2 мл), 4-я группа (40 крыс) – однократное введение суспензии модифицированных хитозаном НЧМ (0,14 г (Fe_3O_4)/кг массы тела, 2,5 мл), 5-я группа (40 крыс) – однократное введение суспензии магнитолипосом (0,14 г (Fe_3O_4)/кг массы тела, 3 мл). Указанные суспензии вводили животным через хвостовые вены. Крыс выводили из эксперимента асфиксией углекислым газом на 1, 7, 14, 21, 40, 60, 90 и 120 сутки после инъекции. Для гистологического и гистохимического анализа семенники крыс фиксировали в 10% забуференном формалине (БиоВитрум, Россия), после чего промывали, обезживали в изопропанол (БиоВитрум, Россия) и заливали в парафиновую смесь *HISTOMIX* (БиоВитрум, Россия). На полуавтоматическом микротоме (МЗП01-Техном, Россия) получали парафиновые срезы толщиной 5 мкм. Для определения в тканях НЧМ, осуществляли постановку гистохимической реакции с ферроцианидом калия (метод Перлса) с последующей докраской срезов гематоксилином и эозином. Определяли количество Перлс-позитивных клеток в 1 мм² среза семенника. Рассчитывали индекс *сперматогенеза* (ИС) по формуле: $ИС = (4 \times a_4 + 3 \times a_3 + 2 \times a_2 + a_1) / 100$, где a_4 – число извитых семенных канальцев, содержащих 4 популяции сперматогенных клеток (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды и сперматозоиды), a_3 – 3 популяции (сперматогонии, сперматоциты и сперматиды), a_2 – 2 популяции (сперматогонии и сперматоциты), a_1 – 1 популяцию (сперматогонии); 100 – количество учтенных канальцев. В каждом микропрепарате семенника измеряли диаметр 100 срезов строго поперечно извитых семенных канальцев при помощи программы *ImageJ* 1.48. Статистическую обработку морфометрических показателей осуществляли при помощи *SPSS* 17.0 с использованием критериев Шапиро-Уилка, Манна-Уитни и Уилкоксона. Уровень значимости был принят $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей, Me ($Q_{25}; Q_{75}$).

Результаты и их обсуждение. Биологические эффекты наночастиц определяются их физико-химическими свойствами. Концентрация железа в суспензии немодифицированных НЧМ составила 5 мг (Fe)/мл (7 мг (Fe_3O_4)/мл), средний размер агломератов НЧМ – 90,4 нм.

Магнитные наносферы представляют собой агломераты НЧМ, на поверхности которых обнаруживается хитозановый слой низкой электронной плотности толщиной 2 нм. Концентрация железа в суспензии покрытых хитозаном НЧМ – 4 мг (Fe)/мл (5,5 мг (Fe_3O_4)/мл). Средний размер магнитных наносфер составил 32,5 нм.

Магнитолипосомы являются сферическими везикулами, стенка которых представлена одним или несколькими билипидными слоями, а в полости определяются отдельные НЧМ или их агломераты. Концентрация железа в суспензии магнитолипосом – 3,5 мг (Fe)/мл (4,8 мг (Fe_3O_4)/мл). Средний размер магнитолипосом – 75 нм.

Ввиду высокой реакционной способности наночастицы обладают рядом негативных с точки зрения применения в биологии и медицине свойств, в частности, участие в свободно-радикальных процессах [2, 3, 10]. Окислительный стресс является одной из причин гено- и цитотоксического эффекта маг-

нитных наночастиц [2]. НЧМ приводят к образованию активных форм кислорода и азота, угнетают активность супероксиддисмутазы, каталазы, снижают концентрацию восстановленного глутатиона и витамина C [6, 7].

Таблица 1

Динамика диаметра извитых семенных канальцев, индекса сперматогенеза и количества Перлс-позитивных клеток семенников крыс экспериментальных групп, $Me (Q_{25}; Q_{75})$

Группа	Экспериментальный срок, сутки							
	1	7	14	21	40	60	90	120
Диаметр извитых семенных канальцев, мкм								
Интактные	252,4 (235,1; 272,4)	258,5 (250,1; 267,2)	260,7 (278,6; 287,9)	258,3 (246,5; 287,4)	272,1 (243,7; 281,7)	286,4 (253,3; 316,3)#	284,5 (278,9; 307,2)	292,3 (279,3; 323,4)
Немодифицированные НЧМ	250,8 (265,3; 281,6)	247,1 (222,9; 263,2)	260,2 (235,8; 282,1)#	250,5 (243,5; 262,9)	255,4 (238,1; 265,6)	283,1 (263,4; 292,1)#	294,3 (281,1; 308,9)	259,7 (238,8; 284,7)#§
Магнитные наносферы	205,0 (189,0; 213,5)*	222,6 (205,4; 280,4)*	213,5 (200,6; 234,1)*	214,1 (200,1; 220,7)*	243,9 (236,1; 265,4)#	265,4 (198,3; 254,6)	271,5 (248,4; 286,1)	252,6 (221,6; 278,8)
Магнитолипосомы	245,9 (227,6; 258,6)	232,0 (214,3; 247,9)	243,7 (235,1; 258,8)	231,8 (217,0; 242,3)	215,9 (233,5; 249,3)#*	194,4 (187,4; 205,6)*	271,5 (225,4; 293,8)#	247,5 (213,0; 278,5)
Индекс сперматогенеза, усл. ед.								
Интактные	3,0 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	3,5 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	4,0 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	4,0 (3,0;4,0)
Немодифицированные НЧМ	4,0 (3,0;4,0)	3,5 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	3,5 (3,0;4,0)	4,0 (3,0;4,0)
Магнитные наносферы	4,0 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	3,5 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	3,5 (3,0;4,0)	3,5 (3,0;4,0)	4,0 (3,0;4,0)
Магнитолипосомы	3,0 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)	4,0 (3,0;4,0)	4,0 (3,0;4,0)	4,0 (3,0;4,0)	4,0 (3,0;4,0)	4,0 (3,0;4,0)	3,0 (3,0;4,0)
Количество Перлс-позитивных клеток в 1 мм ² среза семенника, шт.								
Интактные	1,0 (1,0;2,5)	0,0 (0,0;1,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;2,5)	1,0 (0,0;2,0)	0,0 (0,0;1,5)	1,0 (0,5;2,0)
Немодифицированные НЧМ	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0; 6,3)#	0,0 (0,0;6,3)	0,0 (0,0;12,5)
Магнитные наносферы	31,3(18,8; 50,0)*	25,0(6,3; 37,5)#*	25,0(15,6; 34,4)*	12,5(6,3; 18,8)#*	18,8(12,5; 31,3)#*	25,0(12,5; 40,6)*	31,3(21,9; 37,5)*	6,3(0,0; 12,5)#
Магнитолипосомы	31,3(18,8; 37,5)*	31,3(18,8; 43,8)*	18,8(12,5; 37,5)*	43,8(31,3; 56,3)#*	25,0(18,7; 37,5)#*	37,5(18,8; 43,8)*	12,5(6,25; 18,8)#*	31,3(18,8; 37,5)#*

Примечание: # – отличие от показателя предыдущего срока этой же группы,
 § – отличие показателя крыс, получивших немодифицированные НЧМ, от соответствующего показателя интактных крыс, * – отличие от соответствующего показателя крыс, получивших немодифицированные НЧМ

Структура семенников крыс 2-ой группы не отличается от таковой у интактных животных. На всем протяжении эксперимента в извитых семенных канальцах крыс, подвергшихся введению стабилизирующего раствора, определяются sustentocytes (клетки Сертоли), сперматогонии, сперматоциты I и II порядка, сперматиды, в просветах канальцев определяются сперматозоиды. Межканальцевая соединительная ткань без особенностей, содержит интерстициальные эндокриноциты (клетки Лейдига) и макрофаги. Это согласуется с полученными ранее данными об отсутствии повреждающего действия стабилизирующего раствора на печень, легкие, почки и сердце крыс [1]. Диаметр извитых семенных канальцев крыс всех групп возрастает в ходе эксперимента (табл. 1), что связано с ростом животных. Единичные Перлс-позитивные клетки определяются исключительно в межканальцевой соединительной ткани семенников крыс 1-ой и 2-ой групп (табл. 1). Морфометрические показатели крыс 2-ой группы не

представлены в таблице, так как не отличаются от таковых у интактных животных на протяжении эксперимента.

Введение крысам суспензии немодифицированных НЧМ приводит к полнокровию сосудов микроциркуляторного русла на 21-40 сутки после инъекции, а также снижению диаметра извитых семенных канальцев на 120 сутки, по сравнению с интактными животными (табл. 1). Морфология сперматогенного эпителия и индекс сперматогенеза крыс 3-ей группы на протяжении эксперимента не отличается от таковых у интактных животных (табл. 1). Перлс-позитивные клетки определяются исключительно в строме семенника, морфологически соответствуют интерстициальным макрофагам, обнаруживаются с 60 суток после введения суспензии немодифицированных НЧМ (табл. 1).

Введение суспензии модифицированных хитозаном НЧМ не приводит к альтерации сперматогенного эпителия и интерстициальных эндокриноцитов в исследуемые сроки, тогда как полнокровие сосудов микроциркуляторного русла наблюдается с 1 по 120 сутки эксперимента. Диаметр извитых семенных канальцев крыс 4-ой группы на 1-21 сутки эксперимента ниже, чем у животных 3-ей группы (табл. 1). После однократного внутривенного введения магнитных наносфер индекс сперматогенеза соответствует аналогичному показателю интактных животных (табл. 1). На всем протяжении эксперимента в строме семенников крыс 4-ой группы определяются Перлс-позитивные интерстициальные макрофаги, их количество выше, чем у крыс 3-ей группы. Количество Перлс-позитивных клеток в семенниках крыс 4-ой группы снижается в ходе эксперимента (табл. 1).

Сустентоциты, сперматогенные клетки и интерстициальные эндокриноциты крыс, подвергшихся введению суспензии магнитолипосом, имеют нормальную морфологию на всем протяжении эксперимента. На 7-21 сутки после инъекции магнитлипосом определяется полнокровие сосудов микроциркуляторного русла. Однократное внутривенное введение крысам суспензии магнитолипосом приводит к уменьшению диаметра извитых семенных канальцев на 40-60 сутки эксперимента, по сравнению с аналогичными показателями крыс 3-ей группы (табл. 1). Индекс сперматогенеза крыс 5-ой группы на протяжении эксперимента не отличается от соответствующего показателя интактных животных (табл. 1). Перлс-позитивные клетки морфологически соответствуют интерстициальным макрофагам, их количество больше, чем у крыс 3-ей группы на протяжении эксперимента. Количество Перлс-положительных клеток в семенниках крыс после инъекции магнитолипосом сохраняется на высоком уровне до конца эксперимента (табл. 1).

Таким образом, используемые в эксперименте покрытия препятствуют поглощению НЧМ клетками системы мононуклеарных фагоцитов [4], поэтому большее количество Перлс-позитивных клеток обнаруживается в межканальцевой соединительной ткани семенников крыс 4-ой и 5-ой групп, по сравнению с животными 3-ей группы. Важно, что после инъекции немодифицированных и модифицированных НЧМ Перлс-положительный материал определяется исключительно в межканальцевой соединительной ткани. НЧМ захватываются интерстициальными макрофагами семенника и не проникают через гематотестикулярный барьер [3, 10]. Введение магнитных наносфер и магнитолипосом не приводит к альтерации сперматогенных клеток, что подтверждается значениями индекса сперматогенеза. Обратимое снижение диаметра извитых семенных канальцев у крыс 4-ой и 5-ой групп может быть связано с переходящим угнетением функциональной активности сустентоцитов.

Заключение. Однократное введение суспензий немодифицированных и модифицированных хитозаном и липидами НЧМ не вызывает структурных изменений сперматогенного эпителия, клеток Лейдига и не влияет на активность сперматогенеза. Магнитные наносферы и магнитолипосомы не проникают через гемато-тестикулярный барьер, их применение сопровождается обратимым снижением диаметра извитых семенных канальцев, а также гемодинамическими изменениями в семенниках. Обратимость структурных изменений в семенниках, вызванных однократным внутривенным введением магнитных наносфер и магнитолипосом, делает перспективным их дальнейшее изучение.

Литература

1. Мильто И.В., Суходоло И.В. Структура печени, легкого, почек, сердца и селезенки крыс после многократного внутривенного введения суспензии наноразмерных частиц магнетита // Вестник РАМН. 2012. Т. 67, № 3. С. 75–79.
2. Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles / Liu G. [et al.] // Small. 2013. Vol. 9, № 9-10. P. 1533–1545.
3. Awaad A. Histological and histopathological studies on the protective role of E. purpurea extract after intra-testicular injection of magnetic nanoparticles in male albino rats // J. Histotechnol. 2017. Vol. 40, № 4. P. 100–114.
4. Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice / Noory A. [et al.] // AJB. 2011. Vol. 10, № 7. P. 1221–1227.

5. Surface modification of iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting / Muthiah M. [et al.] // *Biotechnology advances*. 2013. Vol. 31, № 8. P. 1224–1236.
6. Repeated exposure to iron oxide nanoparticles causes testicular toxicity in mice / Sundarraj K. [et al.] // *Environ. Toxicol.* 2017. Vol. 32, № 2. P. 594–608.
7. The effect of iron oxide nanoparticles on sperm numbers and motility in male mice / Nasri S. [et al.] // *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 2015. Vol. 17, № 10. P. e2185.
8. Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review / Brohi R.D. [et al.] // *Frontiers in pharmacology*. 2017. Vol. 8. P. 606.
9. Wu W. Designed synthesis and surface engineering strategies of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications // *Nanoscale*. 2016. Vol. 8, №. 47. P. 19421–19474.
10. Zhou L. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier // *Nanomedicine*. 2012. Vol. 7, № 4. P. 579–596.

References

1. Mil'to IV, Suhodolo IV. Struktura pecheni, legkogo, pochek, serdca i selezenki krysa posle mnogokratnogo vnutrivennogo vvedeniya suspenzii nanorazmernykh chastic magnetita [structure of the liver, lung, kidney, heart and spleen of rats after multiple intravenous injection of suspension of nanosized magnetite particles]. *Vestnik RAMN*. 2012;67(3):75-9. Russian.
2. Liu G, et al. Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small*. 2013;9(9-10):1533-45.
3. Awaad A. Histological and histopathological studies on the protective role of E. purpurea extract after intra-testicular injection of magnetic nanoparticles in male albino rats. *J. Histotechnol.* 2017;40(4):100-14.
4. Noory A, et al. Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice. *AJB*. 2011;10(7):1221-7.
5. Muthiah M, et al. Surface modification of iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting. *Biotechnology advances*. 2013;31(8):1224-36.
6. Sundarraj K, et al. Repeated exposure to iron oxide nanoparticles causes testicular toxicity in mice. *Environ. Toxicol.* 2017;32(2):594-608.
7. Nasri S, et al. The effect of iron oxide nanoparticles on sperm numbers and motility in male mice. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 2015;17(10):e2185.
8. Brohi RD, et al. Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:606.
9. Wu W. Designed synthesis and surface engineering strategies of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale*. 2016;8(47):19421-74.
10. Zhou L. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. *Nanomedicine*. 2012;7(4):579-96.

Библиографическая ссылка:

Мильто И.В., Суходоло И.В., Иванова В.В. Морфометрическая характеристика семенников крыс после однократного введения суспензии модифицированных наночастиц магнетита // *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*. 2018. №4. Публикация 3-17. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/3-17.pdf> (дата обращения: 16.07.2018). *

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-4/e2018-4.pdf>