

## **Влияние наноразмерного магнетита на сократительную активность гладкомышечных сегментов легочной артерии морских свинок**

*Носарев А.В., Абраменко Е.Е., Капилевич Л.В., Васильев В.Н., Дьякова Е.Ю., Табаева А.М., Кироненко Т.А., Перфильева В.В., Мильто И.В.*

### **Influence of nanosized magnetite on the contractile activity of smooth muscle segments of the pulmonary artery of guinea pigs**

*Nosarev A.V., Abramenko Ye.Ye., Kapilevich L.V., Vasiliyev V.N., Diyakova Ye.Yu., Tabayeva A.M., Kironenko T.A., Perfilyeva V.V., Milto I.V.*

*Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск*

© Носарев А.В., Абраменко Е.Е., Капилевич Л.В. и др.

Представлено исследование сократительной активности гладкомышечных сегментов легочной артерии морских свинок механографическим методом, а также морфологической картины легких, воздухоносных путей и сосудов малого круга кровообращения при действии наноразмерного магнетита. Показано, что хроническое ингаляционное поступление наночастиц магнетита оказывает цитотоксический эффект, приводя к воспалительным изменениям воздухоносных путей, паренхимы легких и легочных сосудов, а также к изменению сократительной активности легочной артерии при действии нейротрансмиттеров и медиаторов, реализующих свои функции в физиологических условиях или образующихся в течение воспалительного процесса.

**Ключевые слова:** гладкомышечные клетки, легочная артерия, наночастицы, сигнальные системы, воспаление.

This study investigates the contractile activity of smooth muscle segments of guinea pig pulmonary artery by the method of mechanography and morphological picture of lungs, airways and blood vessels of the pulmonary circulation under the influence of nanosized magnetite. It is shown that chronic inhalation intake of magnetite nanoparticles has a cytotoxic effect, leading to inflammatory changes in the airways, lung parenchyma and pulmonary vessels, as well as a change in contractile activity of the pulmonary artery by the action of neurotransmitters and mediators of exercising their functions under physiological conditions or produced during the inflammatory process.

**Key words:** smooth muscle cells, pulmonary artery, nanoparticles, signaling, inflammation.

УДК 611.131.018.61:577.353:546.723'722-31-022.532:599.324.7

### **Введение**

В настоящее время в связи с растущими темпами развития наноиндустрии актуальной является проблема влияния ее целевых и побочных продуктов на организм человека. Помимо всех прочих возможных путей поступления при целенаправленном использовании наноразмерных частиц в организм человек подвержен бесконтрольному воздействию наночастиц, поступающих ингаляционно [13]. При этом продемонстрирована возможность внелегочного распределения наночастиц. Исследования показали, что наночастицы способны проходить такие барьеры, как слизистая оболочка и стенка сосуда [3, 7, 8, 12]. Большинство

исследователей, занимавшихся изучением вопроса риска для здоровья человека при контакте его с наноразмерными материалами, сходятся во мнении, что хроническое воздействие наноматериалов на различные системы организма может повлечь за собой серьезные патофизиологические эффекты [5, 7, 9, 10, 12, 14].

Легочные сосуды, артериальные и венозные, при ингаляционном поступлении наночастиц могут стать мишенью непосредственного или опосредованного их воздействия. Вместе с тем тонус легочных артерий играет огромную роль в поддержании газообмена на оптимальном уровне [2]. Отсутствие данных о влиянии наночастиц на сократительную активность легочных

сосудов обуславливает актуальность настоящего исследования.

Цель исследования — изучить влияние наноразмерного оксида железа на сократительную активность гладкомышечных сегментов легочной артерии морских свинок.

## Материал и методы

Исследование выполнено на 45 экспериментальных животных — половозрелых морских свинок-самцах.

Животных контрольной группы ( $n = 7$ ) ингаляровали дистиллированной водой по аналогичной схеме.

Для исследования прямого влияния наноразмерного  $Fe_3O_4$  взвесь исследуемых наночастиц добавляли в рабочую камеру, в которой находились изолированные гладкомышечные сегменты. Концентрация наночастиц магнетита в рабочей камере составляла 0,03 мг/мл, время экспозиции — 60 мин.

Для изучения сократительной активности pripravляли дезндотелизированные кольцевые сегменты легочной артерии, эндотелий удаляли механически. Методом механографии исследовали сократительную активность гладких мышц сегментов. Механическое напряжение (МН) сегментов изучали в условиях, близких к изометрическим. Эффект тестирующих препаратов оценивали в процентах от амплитуды контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор Кребса (40 ммоль КСl), последнюю принимали за 100% [1].

В качестве механоэлектрического преобразователя использовали изометрический датчик силы FT10G (Украина). Датчик силы присоединяли к 14-битному АЦП L791 («Л-КАРД», Россия), далее сигнал отображался, записывался и обрабатывался на компьютере с использованием соответствующего программного обеспечения (L-Graph-II, «Л-КАРД», Россия).

Наночастицы магнетита были получены методом механохимического синтеза из солевых систем на базе отдела структурной макрокинетики Томского научного центра СО РАН (г. Томск). Частицы сферической формы диаметром 3—12 нм объединены в слабосвязанные агрегаты. Площадь удельной поверхности 113 м<sup>2</sup>/г. Для изучения эффектов действия наночастиц при их вдыхании животных ( $n = 15$ ) подвергали ингаляционному воздействию аэрозоля взвеси наночастиц  $Fe_3O_4$  (0,025 мг/мл).

Ингаляции проводили ежедневно в течение 60 мин курсом 14 сут с помощью ультразвукового небулайзера «Муссон-1М» (Россия). После окончания курса ингаляции животных умерщвляли.

Для морфологического исследования у животных, подвергавшихся ингаляции магнетитом, и группы контроля забирали прикорневые фрагменты легких, после парафиновой заливки готовили гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином с докраской по методу Перлса (для гистохимического выявления соединений трехвалентного железа). Исследование микропрепаратов проводили при помощи световой микроскопии.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Statistica 6.0 for Windows (StatSoft, США). Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий нормальности Колмогорова—Смирнова. Проверка статистических гипотез о принадлежности выборок к одной генеральной совокупности или совокупностям с одинаковыми параметрами проводилась с помощью рангового  $U$ -критерия Манна—Уитни.

Фактические данные представлены в виде  $X \pm m$ , где  $X$  — среднее значение,  $m$  — ошибка среднего.

## Результаты и обсуждение

У животных контрольной группы, ингалированных дистиллированной водой, наблюдалась инфильтрация стромы мононуклеарными клетками, периваскулярная инфильтрация (в некоторых случаях умеренный интерстициальный отек), бронхоспазм, венозное полнокровие. Такие морфологические изменения характерны для воспалительного процесса.

На препаратах легких животных, ингалированных магнетитом, по сравнению с таковыми группы ингалированных водой гистологическая картина воспаления была более выраженной. Наблюдались выраженный интерстициальный отек, расширение межальвеолярных перегородок, инфильтрация стромы сегментоядерными клетками и наличие плазмочитов в инфильтрате. В области воздухоносных путей, в зоне непосредственного контакта наночастиц с биообъектом определялись перибронхиальная инфильтрация и отек. Бронхиальная стенка характеризовалась отторжением эпителия, повышением количества бокаловидных клеток слизистой оболочки, инфильтрацией мононуклеарными клетками подслизистой. В просвете бронхов обнаружива-

лось большое количество слизи. Патологические изменения затронули и кровеносное русло, отмечались спазм артерий и периартериальная инфильтрация вплоть до выраженного отека. В легочной паренхиме были обнаружены Перлс-позитивные макрофаги в небольшом

количестве. Описанные выше изменения представлены на рис. 1.

В сосудах малого круга кровообращения активация гистаминовых рецепторов вызывает констрикцию [2, 11]. Действие гистамина на исследуемые сегменты приводило к дозозависимому сокращению, максимальная

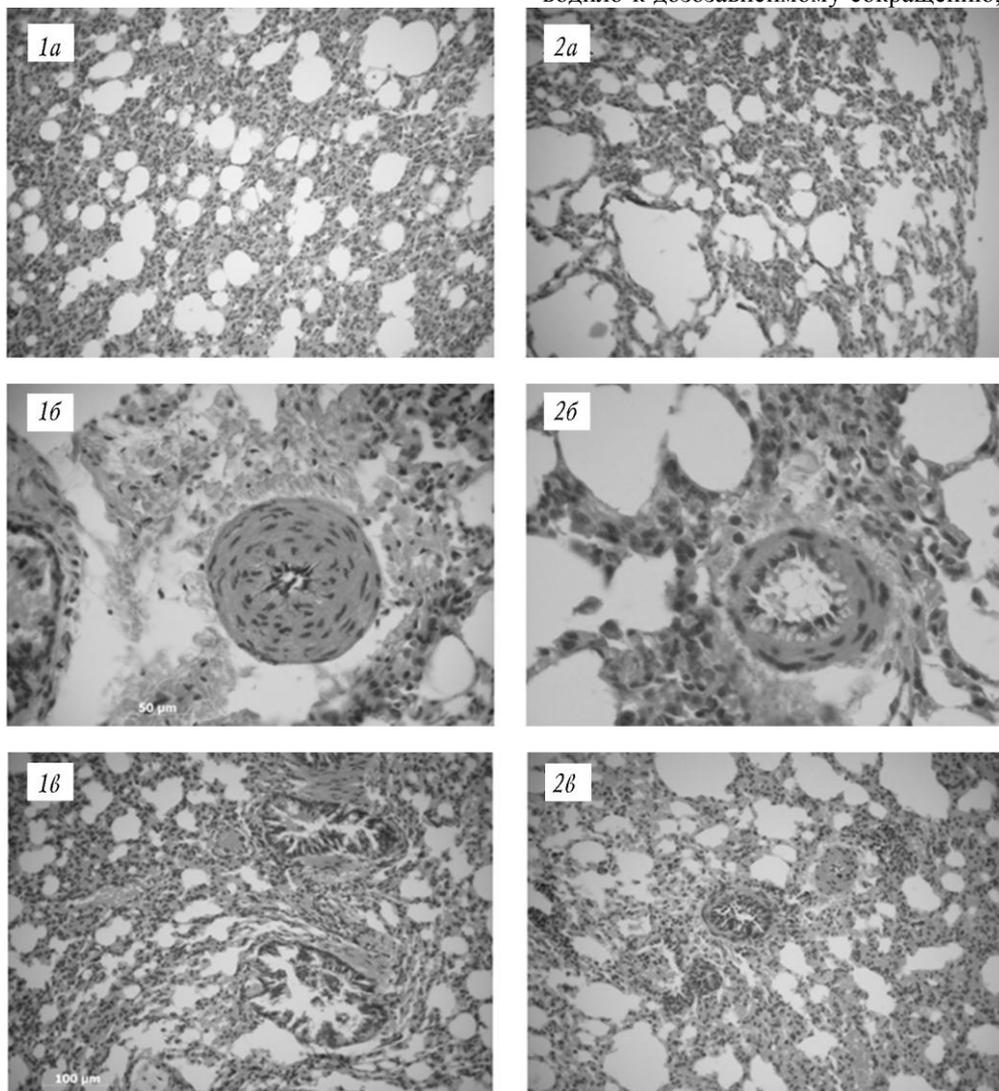


Рис. 1. Световая микроскопия легких морских свинок экспериментальной (1) и контрольной (2) групп: а — расширение межальвеолярных перегородок, выраженный интерстициальный отек, инфильтрация стромы мононуклеарными клетками, ув. 200; б — периартериальная инфильтрация и отек, ув. 400; в — в экспериментальной группе — перибронхиальный отек, отторжение эпителия бронхов, в контрольной группе — спазм бронха, ув. 200. Окраска гематоксилином и эозином с докраской по методу Перлса

амплитуда которого достигалась при добавлении его в концентрации 100 мкмоль (рис. 2,а). Сегменты легочной артерии животных после курса ингаляций на добавление гистамина в концентрации 10 и 100 мкмоль развивали сокращение достоверно меньшее по амплитуде ( $25,9 \pm 4,9\%$ ) от амплитуды контрольного гиперкалиево-

го сокращения по сравнению с контрольными значениями ( $42,5 \pm 4,2\%$ ) ( $p < 0,05$ ) (рис. 2,а). Сокращение, развиваемое сегментами после добавления наночастиц  $Fe_3O_4$  в рабочую камеру, имело большую амплитуду ( $p < 0,05$ ) по сравнению с сокращением интактных сегментов, составляя ( $62,2 \pm 6,8\%$ ) (рис. 2,б).

Принимая во внимание воспалительный ответ на хроническое ингаляционное поступление нанодисперсного магнетита у животных экспериментальной группы, можно предположить, что снижение амплитуды сократительного ответа — проявление развивающейся толерантности гладкомышечных клеток сосуда к действию

гистамина, который, как известно, является медиатором воспаления [4]. Определение  $EC_{50}$  показало значительное снижение чувствительности экспериментальных сегментов к действию гистамина по сравнению с контролем:  $EC_{50}$  в экспериментальной группе сегментов составляла 33 мкмоль, в контрольной — 7,5 мкмоль.

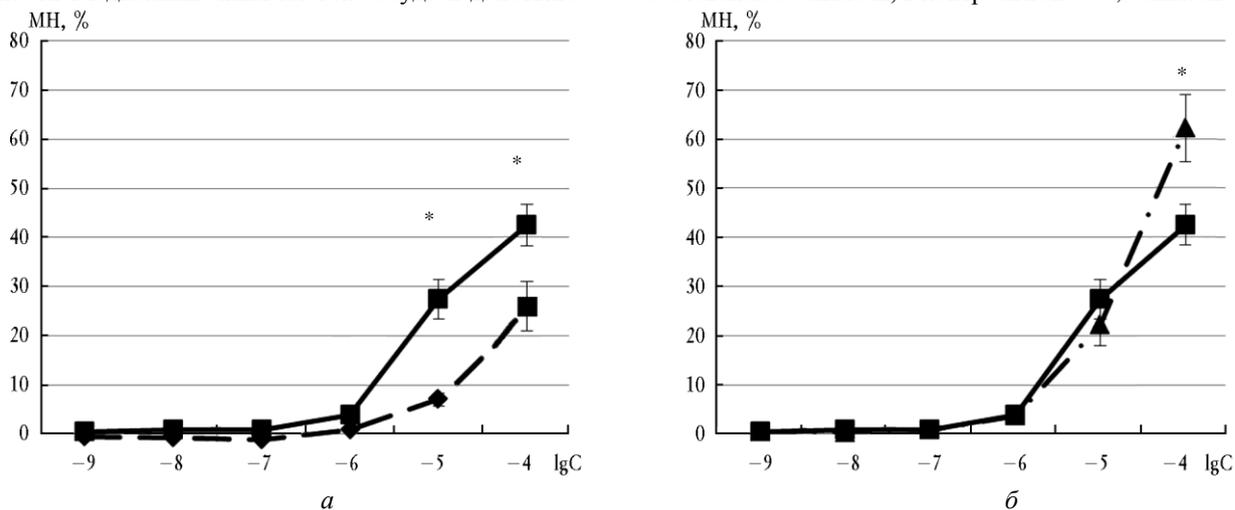


Рис. 2. Зависимость механического напряжения изолированных сегментов легочной артерии от концентрации гистамина (lgC). Сплошная линия — сегменты контрольной группы, штриховая — сегменты животных, подвергавшихся ингаляционному воздействию магнитных наночастиц (а), штрих-пунктирная линия — сегменты, инкубированные с наноразмерным магнетитом *in vitro* (б); \* — достоверность различий между экспериментальной и контрольной группами  $p < 0,05$

Усиление сократительных реакций сегментов при действии на них наночастиц *in vitro* может быть связано с взаимодействием  $Fe_3O_4$  и гистамина, которое приводит к увеличению его сродства к собственным рецепторам. В поддержку этой гипотезы говорит то, что по результатам морфологического исследования сегментов, инкубированных магнетитом, большое скопление Перлс-позитивного материала, представляющего собой сорбировавшиеся при инкубации на-

норазмерные частицы магнетита, обнаружено в основном по периферии сегмента (на поверхности слизистой оболочки и гладкомышечной пластинки).

По литературным данным,  $\alpha_1$ -адреномиметики являются вазоконстрикторами для сосудов большого и малого круга кровообращения [4]. Под действием фенилэфрина происходило дозозависимое сокращение сегментов экспериментальных и контрольной групп в диапазоне концентраций 0,1—100 мкмоль (рис. 3).

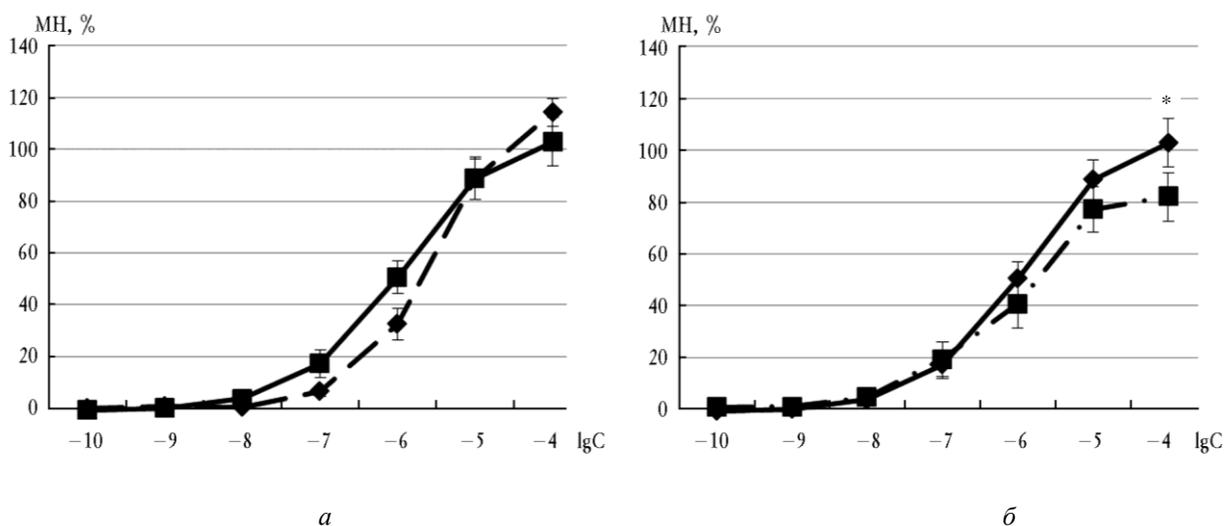


Рис. 3. Зависимость механического напряжения изолированных сегментов легочной артерии от концентрации фенилэфрина (lgC). Сплошная линия — сегменты контрольной группы, пунктирная — сегменты группы животных, подвергавшихся ингаляционному воздействию магнитных наночастиц (а), штрих-пунктирная линия — сегменты, инкубированные с наноразмерным магнетитом *in vitro* (б); \* — достоверность различий между экспериментальной и контрольной группами  $p < 0,05$

Сравнение ответов сегментов контрольной группы и группы ингалированных животных показало тенденцию к увеличению амплитуды сократительного ответа при действии фенилэфрина в концентрации 100 мкмоль сегментов экспериментальной группы, его величина составила  $(114,2 \pm 5,4)\%$ , в то время, как сегменты контрольной группы сокращались до  $(102,8 \pm 9,3)\%$  (рис. 3,а). Сегменты, инкубированные с наноразмерными частицами магнетита в камере, демонстрируют достоверно ( $p < 0,05$ ) более низкоамплитудное сокращение  $(82,0 \pm 9,3\%)$  по сравнению с контрольными значениями (рис. 3,б).

Появление тенденции к увеличению силы сократительного ответа на действие  $\alpha_1$ -адреномиметика можно объяснить, имея данные о протекающей в легких морских свинок воспалительной реакции в ответ на введение наноразмерных частиц магнетита, которые, опираясь на литературные данные, можно охарактеризовать как инициаторов неспецифического воспаления [5, 9, 14]. При воспалительных и гипоксических явлениях в легких стенка легочной артерии становится мишенью действия в избытке образующихся в очаге активных форм кислорода, несколькими путями приводящих к гиперплазии сократительных элементов сосуда и его стойкой констрикции [6]. Возможно, действие системных вазоконстрикторов (адреномиметиков) при ожидаемом увеличении силы сокращения с ростом количества гладкомышечных волокон в стенке в условиях

воспаления корректируется их метаболическим состоянием при хронически поддерживаемом вазоспазме, что соответствует экспериментально полученным данным.  $EC_{50}$  при действии фенилэфрина на сегменты животных экспериментальной группы равна 5 мкмоль, в контрольной группе — 1,5 мкмоль. Это свидетельствует о снижении чувствительности клеток к адренергической стимуляции, что может являться результатом деструкции рецепторов на мембране гладкомышечных клеток при действии на нее АФК.

Как и в случае воздействия на инкубированные с магнетитом сегменты гистамина, изменение амплитуды ответа на аппликацию фенилэфрина можно связывать с влиянием наночастиц на сократительные реакции вне клетки: модификации наноразмерным  $Fe_3O_4$  фенилэфрина, приводящее к снижению его сродства к рецептору, или воздействием магнетита на сам рецептор.

Для уточнения характера влияния наночастиц магнетита в условиях *in vitro* на силу сократительного ответа гладкомышечных сегментов при добавлении сосудосуживающих веществ была проведена серия экспериментов с использованием антагониста гистамина димедрола. При проведении экспериментов менялся порядок добавления димедрола в камеру: до или после аппликации наночастиц. Полученные данные представлены на рис. 4.

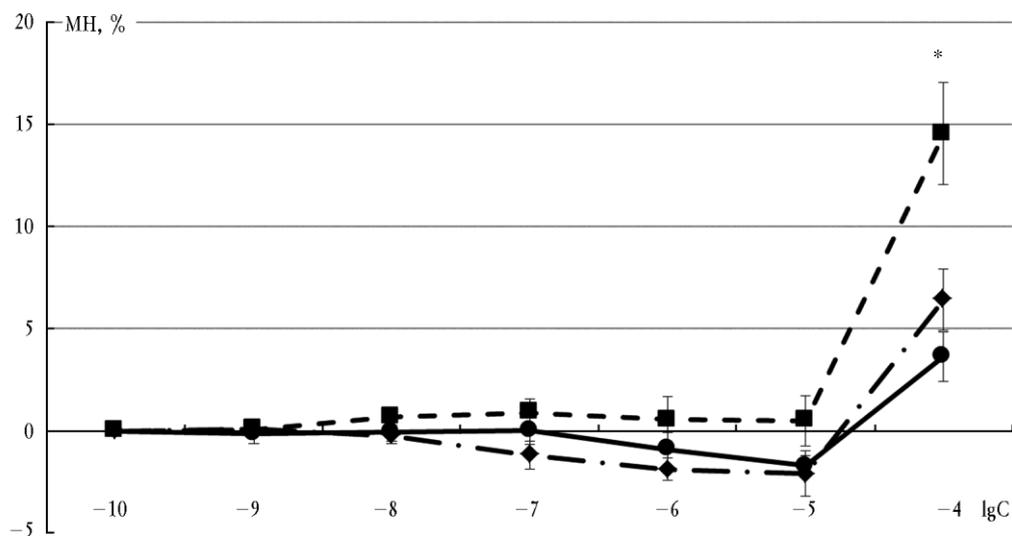


Рис. 4. Зависимость механического напряжения изолированных сегментов легочной артерии от концентрации гистамина (lgC). Сплошная линия — сегменты, предобработанные димедролом; штриховая линия — сегменты, обработанные по схеме: димедрол + Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> *in vitro*; штрихпунктирная линия — сегменты, обработанные по схеме: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> *in vitro* + димедрол; \* — достоверность различий между экспериментальной и контрольной группами  $p < 0,05$

Потенцирование сократительного ответа на до-бавление гистамина наблюдали при введении в камеру наночастиц после блокирования гистаминовых рецепторов, максимальная сила сокращения при действии гистамина в концентрации 100 мкмоль в этом случае составила  $(14,5 \pm 2,5)\%$ , в группе сегментов, обработанных только димедролом без инкубации с Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (группой контроля), амплитуда сократительного ответа была  $(3,6 \pm 1,2)\%$ . Сила сокращения сегментов на гистамин при добавлении сначала наночастиц, затем димедрола составляла  $(6,4 \pm 1,5)\%$ . При сравнении ответов этой группы сегментов с контрольными значениями достоверных различий не выявлено. Можно предположить, что действие наночастиц частично снимает эффект димедрола, возможно вытесняя его с гистаминовых рецепторов либо связываясь с димедролом, частицы наноразмерного оксида железа обволакивают его, что ведет к нарушению комплементарных взаимодействий димедрола с гистаминовыми рецепторами. Отсутствие эффекта наночастиц, добавленных до введения димедрола, можно связать с тем, что воздействие наночастиц на рецептор или на его лиганд (димедрол) отличается от предыдущих экспериментов, когда рецептор являлся мишенью для гистамина, а значит, можно отвергнуть предположение о действии магнетита на гистаминовый рецептор.

### Заключение

Хроническое ингаляционное поступление наночастиц магнетита оказывает цитотоксический эффект, приводя к воспалительным изменениям воздухоносных путей, паренхимы легких и легочных сосудов, а также к изменению сократительной активности легочной артерии при действии нейротрансмиттеров и медиаторов, реализующих свои функции в физиологических условиях или образующихся в течение воспалительного процесса. Хроническое воздействие образующихся при воспалении активных форм кислорода на мускулатуру легочных артерий ведет к их спазму и ремоделированию стенки артерий — гиперплазии и гипертрофии мышечной оболочки. По литературным данным, устойчивая вазоконстрикция и повышение адренергической сократительной активности, приводящие к сужению сосуда и повышению сопротивления легочных артерий, являются факторами формирования легочной гипертензии, тяжелого патологического состояния, приводящего к дыхательной и сердечной недостаточности [13]. Снижение выработки эндотелием сосудов легких оксида азота может быть также вовлечено в этот процесс.

Снижение гистаминаргической сократительной активности легочных артерий при хроническом ингаляционном введении наноразмерного магнетита спо-

собно приводить к нарушению вентиляционно-перфузионного соотношения. Воздухоносные пути на действие гистамина отвечают констрикцией, и сила их сократительного ответа на гистамин при воспалении увеличивается. Это может играть большую роль при таких заболеваниях, как бронхиальная астма. К тому же нарушение функции эндотелия сосудов [12] и эпителия воздухоносных путей при длительном вдыхании наночастиц вызывает повышение проницаемости сосудов, что облегчает поступление в кровь аллергенов и может послужить причиной усугубления аллергического процесса.

Таким образом, потенцирование адренергической сократительной активности и подавление гистаминергической, а также снижение функционального влияния эндотелия на механическое напряжение гладких мышц легочной артерии при хроническом ингаляционном введении наноразмерного магнетита может являться одним из патогенетических звеньев в развитии заболеваний сердечно-сосудистой и дыхательной системы.

#### Литература

1. Капилевич Л.В., Дьякова Е.Ю., Зайцева Т.Н. и др. Исследование влияния взвеси нанодисперсных частиц  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  на сократительные реакции воздухоносных путей животных при ингаляционном воздействии на изолированные сегменты // Вестн. СПб. гос. мед. академии им. И.И. Мечникова. 2009. Т. 30, № 1. С. 74—78.
2. Носарев А.В. Физиологические особенности регуляции тонуса гладких мышц легочной артерии: дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2003. 96 с.
3. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Залялов Р.Р. Токсичность искусственных наночастиц // Казанский мед. журнал. 2009. Т. 90, № 4. С. 578—584.
4. Физиология человека: пер. с англ. В 3 т. Т. 2 / под ред. Р. Шмидта, Г. Тевса. 3-е изд., стереотип. М.: Медицина, 1996. 646 с.
5. Chen B., Jin N., Wang J. et al. The effect of magnetic nanoparticles of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  on immune function in normal ICR mice // Intern. J. of Nanomedicine. 2010. № 5. P. 593—599.
6. Crosswhite P., Sun Zh. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension // J. Hypertens. 2010. V. 28, № 2. P. 201—212.
7. Duffin R., Mills N., Donaldson K. Nanoparticles — a thoracic toxicology perspective // Yonsei Medical J. 2007. V. 48, № 4. P. 561—572.
8. Elder A., Gelein R., Silva V. et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system // Environ Health Perspect. 2000. V. 114, № 8. P. 1172—1178.
9. Gojova A., Guo B., Kota R.S. et al. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition // Environ Health Perspect. 2007. V. 115, № 3. P. 403—409.
10. Jones C., Grainger D. In vitro assessments of nanomaterial toxicity // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2009. V. 61, № 6. P. 438—456.
11. Mauban J., Wilkinson K., Schach Ch. et al. Histamine-mediated increases in cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  involve different mechanisms in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2006. V. 290, № 2. P. C325—C336.
12. Möller W. Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery // Am. J. of Respiratory and Critical Care Medicine. 2008. V. 177, № 3. P. 426—432.
13. Ray P., Yu H., Fu P. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs // J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 2009. V. 27, № 1. P. 1—35.
14. Wu X., Tan Y., Mao H. et al. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells // Intern. J. of Nanomedicine. 2010. № 5. P. 385—399.

Поступила в редакцию 17.11.2011 г.

Утверждена к печати 22.12.2011 г.

#### Сведения об авторах

**А.В. Носарев** — д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**Е.Е. Абраменко** — ординатор кафедры кардиологии ФКП и ППС СибГМУ (г. Томск).

**Л.В. Капилевич** — д-р мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**В.Н. Васильев** — д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой физической культуры и здоровья СибГМУ (г. Томск).

**Е.Ю. Дьякова** — канд. мед. наук, ассистент кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

**А.М. Табаева** — студентка 4-го курса МБФ СибГМУ (г. Томск).

**Т.А. Кироненко** — студентка 4-го курса МБФ СибГМУ (г. Томск).

*В.В. Перфильева* — студентка 6-го курса МБФ СибГМУ (г. Томск).

*И.В. Мильто* — канд. мед. наук, доцент кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

*Носарев Алексей Валерьевич*, тел. 8 (3822) 42-09-54, e-mail: avnosarev@yandex.ru