ОЦЕНКА БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ХИТОЗАНА ГИСТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ ПО ГРОКОТТУ

Журавский С.Г.^{1,2}, Юкина Г. Ю.¹, Паневин А.А.^{1,2},
Почкаева Е.И.², Скорик Ю.А.^{2,3}, Сонин Д.Л.²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт высокомолекулярных соединений» Российской Академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Журавский Сергей Григорьевич
ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Пархоменко, д. 15 лит. Б,
Санкт-Петербург, Россия, 194156.
E-mail: s.jour@mail.ru

Статья поступила в редакцию 06.02.2017
и принята к печати 23.02.2017.

Резюме

Представлен способ морфологической оценки биораспределения вводимых в организм наночастиц хитозана. На парафиновых срезах печени, легкого, головного мозга, селезенки крыс (сток Wistar, самцы, 250-300 г, n=4) проведена гистохимическая реакция серебрения по методу Грокотта после внутривенной инъекции суспензии частиц хитозана со средним размером около 100 нм (фракция от 15 до 200 нм составляла 90%). Аутопсийный материал получали спустя 2 часа после однократного введения 1 мл дисперсии с концентрацией хитозана 2 мг/мл. Впервые показано, что гистохимической реакцией можно выявлять наночастицы хитозана в клетках и тканях. Таким образом, окраска по Грокотту дает возможность оценивать биораспределение, механизм интернализации, биodeградацию, а также эффективность действия лекарственных веществ, переносимых с помощью хитозан-содержащих дисперсных объектов.

Ключевые слова: хитозан, гистохимическое окрашивание, полимерные наночастицы, биораспределение, метенамин Грокотта.

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2017; 4 (1): 63–69.

EVALUATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES BIODISTRIBUTION USING GROCOTT METHENAMINE SILVER STAINING

Zhuravskii S.G.^{1,2}, Yukina G.Yu.¹, Panevin A.A.^{1,2},
Pochkaeva E.I.², Skorik Y.A.^{2,3}, Sonin D.L.²

¹ Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

² Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

³ Institute of macromolecular compounds, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author:

Sergei G. Zhuravskii
Federal Almazov North-West Medical
Research Centre
Parkhomenko str. 15-B, Saint Petersburg,
Russia, 194156
E-mail: s.jour@mail.ru

Received 06 February 2017 ; accepted 23 February 2017.

Abstract

We show the utility of morphological method for evaluation of biodistribution of chitosan nanoparticles administered into an organism. Grocott methenamine silver staining was conducted with paraffin-embedded sections of liver, lung, brain and spleen (male Wistar rats, 250-300 g, n = 4) obtained 2 hours after intravenous injection of 1 mL suspension of chitosan nanoparticles at a concentration of 2 mg/mL. The average size of chitosan nanoparticles was about 100 nm (fraction ranging from 15 to 200 nm was 90%). It has been shown for the first time that the histochemical reaction can be used to identify chitosan nanoparticles into cells and tissues. Thus, Grocott silver staining enables to evaluate the biodistribution, cellular internalization and biodegradation of chitosan-containing drug delivery nanosystems.

Key words: chitosan, histochemical staining, Grocott methenamine silver staining, polymer nanoparticles, biodistribution

For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2017; 4 (1): 63–69.

Список сокращений:

НЧХ — наночастицы хитозана.

Введение

Доклинические исследования *in vivo* систем адресной доставки на основе хитозана и его производных [1, 2] на определенном этапе сталкиваются с задачей получить представление об их местном и системном биораспределении. Для этого используют различные решения: радионуклидные методы [3–6], биолюминесценцию с люциферазой [7, 8], флуоресцентное окрашивание (флуоресцеином, родамином В) [9–12]. Однако эти методы не применяются широко, поскольку требуют соответствующего высокотехнологичного оборудования и дорогостоящих реагентов.

Поскольку хитозан представляет дезацетилированное производное хитина, мы предположили, что

биораспределение хитозана в тканях можно визуализировать гистологическим способом для выявления хитин-содержащего мицелия грибов — возбудителей висцеральных микозов. Для этого используется ряд гистохимических реакций, наиболее известная из которых ШИК-реакция. В России распространена ее модификация по А.Л. Шабадашу, которую используют для выявления молодых (растущих) участков мицелия [13; с. 23, 228–234]. ШИК-реакция уже применялась для визуализации хитозана [14, 15], однако выраженность ложноположительного результата из-за неспецифичности субстрата окрашивания (внутриклеточные включения гликопротеинов, гликозаминогликанов, гликолипидов и ряда жирных кислот) делает метод малоинформативным.

Другой методикой гистохимического выявления мицелия является реакция серебрения по методу Грокотта [16]. В отличие от ШИК-реакции,

окраска по Грокотту имеет существенно большую специфичность. По этой причине, несмотря на распространение в патоморфологии молекулярной диагностики (иммуногистохимии, ПЦР в режиме реального времени, гибридизации *in situ*), этот метод до сих пор остается востребованным [17, 18]. Чувствительность этой реакции принципиально не уступает иммуногистохимическому анализу [19]. В ходе окрашивания хитин-содержащие клеточные стенки мицелия приобретают черный цвет, при этом фон представлен в зеленовато-голубоватых оттенках [16] (рис. 1 а, б).

Цель настоящей работы — оценить возможность выявления гистохимической реакцией серебра по методу Грокотта наночастиц хитозана (НЧХ) в тканях экспериментального животного.

Материал и методы

Исследование проводили на 4 самцах крыс стока Wistar массой 220-250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария конвенциональной категории. Животных разделили на 2 группы: 1-я — контрольная группа ($n=2$) с введением физиологического раствора (0.9% NaCl); 2-я — группа ($n=2$) с введением суспензии НЧХ в физиологическом растворе. Образец НЧХ получали размолот исходного низкомолекулярного хитозана (448869, Sigma-Aldrich) в планетарной шаровой мельнице РМ 100 СМ в размольном стакане объемом 125 мл стальными шарами диаметром 5 мм. В размольный стакан помещали 5 г хитозана и 50 мл дистиллированной воды. Обработку проводили в течение 1 часа с частотой вращения 250 об/мин. После размол НЧХ отфильтровывали с помощью мембранного фильтра Omnipore фирмы Millipore с размером пор 0,2 мкм. Размер НЧХ определяли на лазерном дифракционном анализаторе размера частиц Mastersizer 3000 (Malvern Instruments,

США). Средний размер НЧХ составил около 100 нм (фракция от 15 до 200 нм составляла 90%).

Суспензию НЧХ в физиологическом растворе с концентрацией хитозана 2.0 мг/мл (определена гравиметрически) вводили внутривенно, однократно, в объеме 1.0 мл. Данная концентрация суспензии НЧХ была взята как максимально возможная для получения наиболее интенсивного биораспределения, дальнейшее увеличение концентрации НЧХ приводит к нестабильности суспензии и выпадению осадка.

Инъекции проводили в хвостовую вену при соблюдении правил асептики и антисептики. Стерильность суспензии обеспечили ультрафиолетовым облучением в течение 2 часов. Манипуляции с животными выполняли в условиях анестезии «Золетиллом» (6 мг/кг), вводимого внутривенно.

Выведение из эксперимента осуществляли через 2 часа после инъекции. Для гистологического анализа печень, легкие, головной мозг и селезенку фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7,4), обезживали в растворах этанола с возрастающей концентрацией и заливали в парафин по стандартной гистологической методике. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм для обзорной гистологической оценки окрашивали гематоксилином и эозином. Для проведения гистохимической реакции использовали оригинальный набор реактивов для окрашивания по методу Грокотта (ООО «Эргопродакшн», Россия). Для сравнения на гистологических срезах была поставлена ШИК-реакция при помощи соответствующего набора реагентов (ООО «Биовитрум», Россия). Характер биораспределения Ag-положительных включений в изучаемых органах оценивали визуально на световом микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Япония) при увеличении в 100, 400 и 1000 раз. Фотосъемку гистологических объектов выполняли в 5-7 полях зрения микроскопа, используя цифровую микрофотокамеру.

Рисунок 1.

а) Слизистая оболочка пищевода человека. Биопсия. Кандидозный эзофагит. Почкующиеся клетки и псевдогифы грибов *Candida albicans* на эзофагеальной язве. Окраска по Грокотту. Ув. $\times 100$.

б) То же. Ув. $\times 1000$.

Рисунок 2.

- а) Печень крысы спустя 2 часа после введения наночастиц хитозана. Окраска ШИК-реакцией. Ув. $\times 100$.
 б) Печень крысы спустя 2 часа после введения наночастиц хитозана. Окраска по Грокотту. Ув. $\times 100$.
 в) Печень крысы. Интактное животное. Окраска по Грокотту. Ув. $\times 200$.
 г) Гепатоциты спустя 2 часа после введения наночастиц хитозана. Окраска по Грокотту. Ув. $\times 1000$.

Результаты

Введенные внутривенно НЧХ выявляются в тканях с помощью гистохимической реакции по методу Грокотта. Визуально максимальная интенсивность окрашивания, спустя 2 часа после введения суспензии НЧХ, наблюдается в печени. Окрашенные включения выявлялись как в гепатоцитах, так и в клетках Купфера. Гепатоциты, участвующие в интернализации НЧХ, имеют равномерное светло-бежевое окрашивание цитоплазмы, их ядра при этом не визуализируются. В печеночных дольках четко видны зоны интернализации НЧХ по аргентофильным включениям (рис. 2 б). Иногда отложения окрашенного материала представлены в виде колец. Значительная часть клеток содержит крупные, нередко заполняющие всю цитоплазму, гранулы (рис. 2 г). Для сравнения предлагаем препарат ткани печени интактного животного (рис. 2 в).

В легком аргентофильный субстрат представлен менее интенсивно. Он расположен преимущественно в интерстициальных макрофагах межалвеолярных перегородок (рис. 3 б). Одновременно в цитоплазме альвеолярных макрофагов на этом сроке наблюдаются более мелкие гранулы и в сравнительно меньшем количестве. На рис. 3 (а) представлена структура респираторного отдела легкого, демонстрирующая низкую информативность ШИК-реакции для выявления НЧХ. Особенностью биораспределения в легком

НЧХ, окрашенных по методу Грокотта, на этом сроке стали крупные включения в адвентиции артерий (рис. 3 г). Неспецифическим объектом окрашивания здесь являются эластические и коллагеновые волокна стенок артерий, коллагеновые волокна в стенке бронхов, бронхиол и вокруг альвеол. Эти структуры окрашиваются в разные тона коричневого цвета, не достигая при этом насыщенного черного цвета.

Нервная ткань головного мозга, а также паренхима селезенки на этом сроке эксперимента по методу Грокотта не окрашиваются. В первом случае тканевая изоляция объясняется наличием гемато-энцефалического барьера. Понимание отсутствия Ag-положительных включений в селезенке требует проведения дополнительных исследований.

Обсуждение

Хитозан и его производные активно изучаются для решения задач направленной лекарственной доставки, биопротезирования, клеточного культивирования и пр. Рассматривая гистологические возможности анализа биораспределения хитозана *in vivo*, мы пришли к заключению, что оптимальной для этой задачи представляется гистохимическая методика окраски с метенамином серебра по Грокотту. Реакция известна в патологоанатомической диагностике для микроскопического выявления микрофлоры возбудителей глубоких микозов.

Рисунок 3.

- а) Легкое крысы. Респираторный участок легочной паренхимы. Окраска ШИК-реакцией. Ув. $\times 200$.
 б) Легкое крысы. Интерстициальные макрофаги в альвелярных перегородках. Окраска по Грокотту. Ув. $\times 400$.
 в) Артерия легкого крысы. Имбибиция мышечного слоя окрашенными частицами хитозана. Окраска ШИК-реакция. Ув. $\times 400$.
 г) Артерия легкого крысы. Имбибиция мышечного слоя окрашенными частицами хитозана. Окраска по Грокотту. Ув. $\times 400$.

Анализ системного биораспределения хитозана этим методом проводился впервые. Сравнение двух гистохимических реакций показало, что, в отличие от ШИК-реакции, серебрением по Грокотту получается достаточно контрастная на общем фоне визуализация включений (рис. 2 б и 2 г). Постановка экспериментов с разными сроками наблюдений и различными размерами частиц хитозана позволит проводить на таком материале морфометрический анализ. При этом возможно оценивать интенсивность целевого доступа по площади окрашенных клеточных зон, а по картине цитоплазмы (гомогенное окрашивание, присутствие мелких гранул или более крупных включений) делать представление о механизмах интернализации.

Преимуществом реакции по Грокотту оказывается существенно большая специфичность (рис. 2 б). Для сравнения, при ШИК-окрашивании печень в норме дает положительную реакцию из-за наличия включений гликогена, гликозаминогликанов и гликолипидов в гепатоцитах (рис. 2 а). Методика окрашивания по Грокотту подобрана для выявления хитин-содержащих объектов, чем минимизируется появление неспецифических ложных окрашиваний, поскольку ткани ни в норме, ни в патологии (кроме случаев висцеральных микозов)

не содержат объектов такой или подобной природы.

Метод Грокотта принципиально не уступает по своей наглядности в визуализации НЧХ флуоресцентным красителям (родамин Б) [9]. Немаловажно, что в случае серебрения получаются долговечные гистологические препараты. Это становится особенно актуальным при необходимости сохранять архивный материал, полученный в ходе доклинических исследований.

С помощью окраски по Грокотту можно оценивать не только биораспределение хитозана, но и характеризовать биодеградацию («период полувыведения») инкорпорируемых инъецируемых или имплантируемых хитозан-содержащих конструкций. Выявление среди клеток органов-мишеней, фиксирующих аргентофильные включения, клеток с морфологическими признаками некроза и апоптоза в органах-мишенях, может быть востребовано при скрининговых исследованиях токсичности хитозан-содержащих дисперсных систем доставки. Метод доступен для условий стандартно оснащенной гистологической лаборатории. Отметим, что результат данной реакции гистохимического окрашивания достигался также на материале влажного формалинового архива, которому на момент изготовления парафиновых блоков было около

1 года. Таким образом, для предложенного способа характеристики биораспределения и интернализации хитозана не требуется быстрота обработки полученного некропсийного материала.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Berezin AS, Lomkova EA, Skorik YA. Chitosan conjugates with biologically active compounds: design strategies, properties, targeted drug delivery (review). Russ. Chem. Bull. 2012; 61(4): 781-795. In Russian. [Березин А. С., Ломкова Е. А., Скорик Ю. А. Конъюгаты хитозана с биологически активными соединениями: стратегии конструирования, свойства, направленный транспорт к биомишени. Известия Академии наук. Серия химическая. 2012; 4: 778-795]
2. Kritchenkov AS, Andranovits S, Skorik YA. Chitosan and its derivatives: vectors in gene therapy. Russ. Chem. Rev. 2017; 86(3): 231-239. [In Russian: Критченков А.С., Andranovits S, Скорик Ю. А. Хитозан и его производные: векторы в генной терапии. Успехи химии. 2017; 86(3): 101-118].
3. Suzuki YS, Momose Y, Higashi N, et al. Biodistribution and kinetics of holmium-166-chitosan complex (DW-166HC) in rats and mice. J. Nucl. Med. 1998; 39(12): 2161-2166.
4. Seong SK, Ryu JM, Shin DH, et al. Biodistribution and excretion of radioactivity after the administration of 166Ho-chitosan complex (DW-166HC) into the prostate of rat. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2005; 32(8): 910-917.
5. Hwang H, Kwon J, Oh PS, et al. Peptide-loaded nanoparticles and radionuclide imaging for individualized treatment of myocardial ischemia. Radiology. 2014; 273(1): 160-167.
6. Clementino A, Batger M, Garrastazu G, et al. The nasal delivery of nanoencapsulated statins — an approach for brain delivery. Int. J. Nanomedicine. 2016; 11: 6575-6590.
7. Hwang DW, Jang SJ, Kim YH, et al. Real-time in vivo monitoring of viable stem cells implanted on biocompatible scaffolds. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2008; 35(10):1887-1898.
8. Mizuno T, Mohri K, Nasu S, et al. Dual imaging of pulmonary delivery and gene expression of dry powder inhalant by fluorescence and bioluminescence. J. Control Release. 2009; 134(2): 149-154.
9. Skorik YA, Golyshev AA, Kritchenkov AS, et al. Development of drug delivery systems for taxanes using ionic gelation of carboxyacyl derivatives of chitosan. Carbohydr. Polym. 2017; 162: 49-55.
10. Moraru AD, Costuleanu M, Sava A, et al. Intraocular biodistribution of intravitreal injected chitosan/gelatin nanoparticles. Rom. J. Morphol. Embryol. 2014; 55(3): 869-875.
11. Moraru AD, Costuleanu M, Costin D, et al. Intraocular biodistribution of intravitreal injected fluorescent dexamethasone-chitosan nanoparticles in rabbit eyes. Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. 2015; 119(2):484-90.
12. Hyung Park J, Kwon S, Lee M, et al. Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing hydrophobic moieties as carriers for doxorubicin: in vivo biodistribution and anti-tumor activity. Biomaterials. 2006; 27(1): 119-126.
13. Tsinerling AV. Sovremennyye infektsii. Patologicheskaya anatomiya i voprosy patogenez. SPb.: SOTIS, 1993. p. 363. In Russian [Цинзерлинг А. В. Современные инфекции. Патологическая анатомия и вопросы патогенеза. СПб.: СОТИС, 1993. с. 363].
14. Plánka L, Nečas A, Crha M, et al. Treatment of a bone bridge by transplantation of mesenchymal stem cells and chondrocytes in a composite scaffold in pigs: experimental study. Acta Chir. Orthop. Traumatol. Cech. 2011; 78(6): 528-536.
15. Tai BC, Du C, Gao S, et al. The use of a polyelectrolyte fibrous scaffold to deliver differentiated hMSCs to the liver. Biomaterials. 2010; 31(1): 48-57.
16. Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. Am. J. Clin. Pathol. 1955; 25(8): 975-979.
17. Zhang R, Wang S, Lu H, et al. Misdiagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a clinical analysis of 26 immunocompetent patients. Int. J. Clin. Exp. Med. 2014; 7(12): 5075-5082.
18. Bernardeschi C, Foulet F, Ingen-Housz-Oro S, et al. Cutaneous Invasive Aspergillosis: Retrospective Multicenter Study of the French Invasive-Aspergillosis Registry and Literature Review. Medicine (Baltimore). 2015; 94(26): 1-9.
19. Ma L, Xu R, Shi J, et al. Identification of fungi in fungal ball sinusitis: comparison between MUC5B immunohistochemical and Grocott methenamine silver staining. Acta Otolaryngol. 2013; 133(11):1181-1187.

Информация об авторах:

Журавский Сергей Григорьевич — д.м.н., руководитель научно-исследовательской группы экспериментальной патоморфологии Центра экспериментального биомоделирования ИЭМ ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, ведущий научный сотрудник лаб. слуха и речи НИЦ «ПСПБГМУ им. акад. И. П. Павлова»;

Юкина Галина Юрьевна — к.б.н., заведующая лабораторией патоморфологии НИЦ «ПСПБГМУ им. акад.

И. П. Павлова», доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии НИЦ «ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова»;

Паневин Алексей Александрович — младший научный сотрудник научно-исследовательской группы экспериментальной патоморфологии Центра экспериментального биомоделирования ИЭМ ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, аспирант лаб. слуха и речи НИЦ «ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова»;

Почкаева Евгения Игоревна — младший научный сотрудник лаборатории микроциркуляции и метаболизма миокарда Центра экспериментального биомоделирования ИЭМ ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ;

Скорик Юрий Андреевич — к.х.н., заведующий лабораторией природных полимеров ИВС РАН, заведующий химико-аналитическим отделом ИЭМ ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Сонин Дмитрий Леонидович — к.м.н., заведующий лабораторией микроциркуляции и метаболизма миокарда Центра экспериментального биомоделирования ИЭМ ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ.

Author information:

Sergey G. Zhuravskii, MD, DSc, Head of the Laboratory of Experimental Histopathology, Center of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre; Leading Researcher at the Laboratory of Hear and Speech,

Research Center of the Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Galina Yu. Yukina, PhD, Head of the Laboratory of Pathomorphology, Research Center of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; Associate Professor at the Histology, Cytology and Embryology Department, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Aleksey A. Panevin, Junior Researcher at the Laboratory of Experimental Histopathology, Center of Experimental Biomodeling, Institute for Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre; PhD Student at the Laboratory of Hear and Speech, Research Center of the Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Evgenia I. Pochkaeva, Junior Researcher at the Division of Microcirculation and Myocardial Metabolism, Center of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Yury A. Skorik, PhD, Head of the Laboratory of Natural Polymers, Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences; Head of the Analytical Chemistry Division, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Dmitrii L. Sonin, MD, PhD, Head of the Division of Microcirculation and Myocardial Metabolism, Center of Experimental Biomodeling, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre.