

УДК 612.017:661.718.5:612.118.24

РЕАКЦИЯ МАКРОФАГОВ И ТУЧНЫХ КЛЕТОК ЛЁГКИХ КРЫС НА ПАРЕНТЕРАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

Сухорукова Е.Г., Юкина Г.Ю., Половников И.В., Крыжановская Е.А.

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, e-mail: len48@inbox.ru*

В настоящее время диоксид кремния получил широкое распространение в самых различных областях медицины: диагностике заболеваний, терапии, фармацевтике. Диоксид кремния рассматривается как многообещающий биосовместимый и биodeградируемый материал. Однако для безопасного использования в биомедицинских целях уникальных возможностей наноструктур кремния, а также для нивелирования их токсических эффектов, необходимо детальное изучение взаимодействия этих наночастиц с клетками и тканями *in vivo*. Целью настоящей работы явилось изучение реакции макрофагов и тучных клеток в респираторном отделе лёгкого крыс в ответ на однократное парентеральное введение наночастиц диоксида кремния (НЧДК) сферической формы, размером 12 нм. На самцах крыс стока Wistar ($n = 30$) на 21 сутки, через 2 и 4 месяца после введения НЧДК гистологическим и иммуногистохимическим методами показано развитие хронического асептического воспаления в интерстиции лёгкого на всех сроках эксперимента, представленное макрофагальной инфильтрацией без привлечения клеток лимфоидного ряда, нейтрофилов и эозинофилов. НЧДК проходят через аэрогематический барьер и приводят к увеличению пула альвеолярных макрофагов. Тучные клетки не реагируют на парентеральное введение НЧДК, не мигрируют в межальвеолярные перегородки, их число перибронхиально и перивазально не увеличивается. На протяжении 4 месяцев эксперимента не наблюдалось соединительнотканного ремоделирования в интерстиции респираторного отдела и морфологических признаков, характерных для силикоза лёгких.

Ключевые слова: респираторный отдел легких крыс, наночастицы диоксида кремния, макрофаги, тучные клетки, сурфактант

MACROPHAGES AND MAST CELLS RESPONSE IN RATS LUNGS AFTER PARENTERAL ADMINISTRATION OF THE SILICON DIOXIDE NANOPARTICLES

Sukhorukova E.G., Yukina G.Yu., Polovnikov I.V., Kryzhanovskaya E.A.

First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, e-mail: len48@inbox.ru

Currently, silicon dioxide is widely used in various fields of medicine: diagnostics, therapy and pharmaceuticals. Silicon dioxide is considered as a promising biocompatible and biodegradable material. However, for its safe use, a detailed study of its possible toxic effects, the processes of nanoparticles interaction with cells and tissues *in vivo* is required. The aim of the presented research was the assessment of macrophages and mast cells response in rats lungs after single parenteral administration of the spherical silicon dioxide nanoparticles (SDN). Experiments were conducted on male Wistar rats ($n = 30$). Spherical nanoparticles (12 nm) were injected parenterally once. The follow-up was 21 days, 2 and 4 months. Histology and immunohistochemistry revealed chronic aseptic inflammation development in the lung interstitium, represented by macrophage infiltration without involvement of lymphoid cells, neutrophils and eosinophils. SDN passed through the airborne barrier, which led to an increase of the alveolar macrophages amount. After 4 months, there were no signs of connective tissue remodeling in interstitium or lung silicosis.

Keywords: rat lungs, silicon dioxide nanoparticles, macrophages, mast cells, surfactant

Исследование влияния объектов малых размеров (наночастиц) на различные органы и ткани животных является одним из приоритетных направлений развития современной медицинской науки. В настоящее время наибольшей популярностью пользуются наночастицы таких веществ, как медь, золото, диоксид титана, углерод и диоксид кремния. При этом диоксид кремния относится к соединениям, получившим широкое распространение в самых различных областях медицины: диагностике заболеваний, терапии, фармацевтике и других. Во многом такое обширное использование определяется возможностью задания специфических свойств путем модификации структурного построения этого соединения. Исключительные свойства разветвленной поверхно-

сти соединений диоксида кремния создают благоприятные условия для взаимодействия с различными биологическими средами. Благодаря этому, данное вещество может выступать как многообещающий биосовместимый и биodeградируемый материал, который способен проникать через гистогематические барьеры организма и может использоваться для целенаправленного транспорта различных лекарственных препаратов и диагностических средств [1]. Однако эти же свойства наночастиц диоксида кремния предполагают и потенциальные риски для организма. Так, в ряде исследований показано, что наночастицы диоксида кремния оказывают токсическое действие на некоторые клетки млекопитающих [2]. Данное обстоятельство указывает на то, что

для гарантии безопасного использования в биомедицинских целях уникальных возможностей наночастиц диоксида кремния, а также для нивелирования их токсических эффектов, необходимо продолжение детального изучения взаимодействия этих наночастиц с клетками и тканями *in vivo*.

В ряде исследований показано выраженное сродство диоксида кремния к тканям респираторного отдела лёгких и при парентеральном, и при ингаляционном введении, что обусловлено морфофункциональными особенностями легочной ткани [3]. Известно, что размеры частиц являются одним из определяющих факторов в степени проявления токсических свойств наночастиц с последующей активацией макрофагов и развитием пневмофиброгенеза [4]. По этим причинам важным моментом остаётся определение схожести реакции тканей лёгкого на парентеральное введение наночастиц диоксида кремния с лёгочным силикозом и поиск оптимального размера частиц, при котором сохраняется «сродство» к лёгочной ткани, но степень токсического воздействия – минимальна. Наш научный интерес определился изучением общих вопросов неспецифических механизмов, связанных с естественными морфофункциональными особенностями лёгкого в ответ на парентеральное введение диоксида кремния и особенностей реактивных изменений, характеризующих степень безопасности для органа-мишени и организма в целом.

Целью настоящей работы явилось изучение реакции макрофагов и тучных клеток респираторного отдела лёгкого крыс в ответ на однократное парентеральное введение наночастиц диоксида кремния (НЧДК) сферической формы размером 12 нм.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 30 соматически здоровых самцах крыс стока Wistar, массой 220–250 г (ФГУП «ПЛЖ «Рапполово», Россия), содержащихся в стандартных условиях вивария конвенциональной категории.

Животные были разделены на 2 группы: 1) контроль (n = 15) – с введением 1 мл физиологического раствора (К); 2) экспериментальная группа (n = 15) – с введением 1 мл суспензии НЧДК в физиологическом растворе (Э). Суспензия НЧДК (кремнезем, Аэросил 200, SiO₂, частицы сферической формы с размером 12 нм) вводилась однократно в хвостовую вену в объеме 1 мл при концентрации кремнезема 2 мг/мл. Манипуляции с животными проводили в условиях анестезии раствором золетила (6 мг/кг), вводимого внутривенно. При экс-

периментальных исследованиях руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986 г.) и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными, 1996 г.

Выведение из эксперимента и забор материала для исследования осуществляли на 21 сутки, через 2 и 4 месяца после введения НЧДК, по 5 животных в группе. Для гистологического анализа лёгкое в растянутом состоянии фиксировали в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7,4) в течение суток, затем получали фронтальный срез доли левого лёгкого, с обязательным присутствием долевого и сегментарных бронхов, лёгочных сосудов и альвеолярной ткани, покрытой висцеральной плеврой. Парафиновые блоки изготавливали по стандартной гистологической методике. Для получения сопоставимых результатов от всех животных образцы обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Accu-Cut SRT 200 (Sakura, Япония) и окрашивали гематоксилином и эозином. Визуализацию тучных клеток (ТК) проводили окрашиванием толуидиновым синим (Биовитрум, Россия). Для иммуногистохимического выявления макрофагов использовали первичные моноклональные мышинные антитела Anti-CD68 antibody (ab 31630) (Abcam, Великобритания). Для выявления связавшихся первичных антител использовали мультимерную безбиотинную систему детекции Reveal-Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience Corporation, USA). Препараты докрашивали гематоксилином Майера (Биовитрум, Россия).

Подсчёт альвеолярных, интерстициальных макрофагов (аМФ и иМФ соответственно) и ТК производили на цифровых изображениях срезов респираторного отдела лёгкого, полученных при помощи светового микроскопа Leica DM750 (Leica, Германия) и цифровой фотокамеры ICC50 (Leica, Германия), с помощью прикладной компьютерной программы анализа изображений ImageScore Color (версия M). Для каждого животного на срезе подсчитывали число CD68+ клеток в интерстиции лёгкого и в альвеолах и ТК, располагающихся преимущественно периваскулярно и перибронхиально, в 20 полях зрения, площадью 0,33×0,25 мм каждое поле, при объективе x10, окуляре x40.

Статистическую обработку полученных количественных данных проводили с ис-

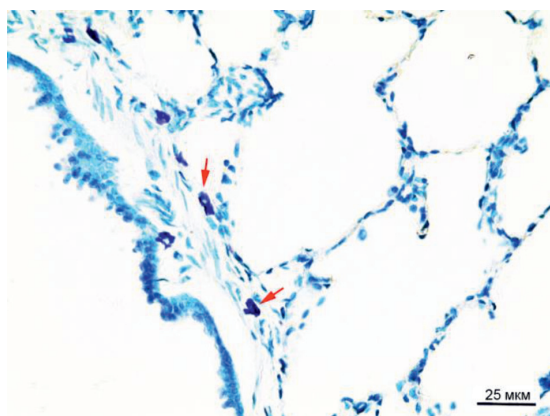
пользованием стандартного пакета программ (Statistica 7.0 Stat.Soft for Windows). Вычисляли среднее арифметическое значение и его стандартную ошибку ($M \pm m$), оценку значимости различий показателей проводили с применением критерия Вилкоксона. Значимость различий определяли при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

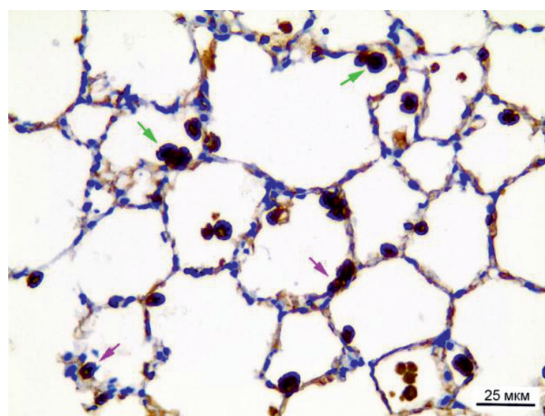
У животных во всех контрольных группах макроскопически лёгкие розового цвета, мягко-эластичные. Микроскопически архитектура ткани сохранена, стенка бронхов не утолщена, эпителий бронхов без особенностей, в просвете бронхов содержимого нет, плевра не утолщена. Бронхоассоциированная лимфоидная ткань без особенностей. Отмечается умеренное полнокровие капилляров интерстиция. В интерстиции респираторного отдела содержится полиморфный клеточный пул, включающий в основном компоненты ма-

крофагального (иМФ), лимфоидного ряда, с присутствием эозинофильных лейкоцитов. ТК выявляются перибронхиально вокруг долевого и сегментарных бронхов, и около крупных сосудов (рисунок, а), в интерстиции респираторного отдела встречаются единичные ТК. В альвеолах отмечаются единичные аМФ (рисунок, б).

У экспериментальных животных на всех сроках эксперимента макроскопически лёгкие соответствуют контрольным. Микроскопически архитектура бронхов и респираторного отдела сохранена. На 21 сутки эксперимента визуально межальвеолярные перегородки не утолщены, но число иМФ увеличивается до 180% и составляет $9 \pm 0,8$ в поле зрения, что значительно отличается от контрольных значений. В просвете альвеол содержимого нет, но наблюдается незначимое увеличение числа аМФ до $8 \pm 0,7$ клеток в поле зрения. Число ТК не изменяется по сравнению с контрольными значениями (таблица).



а)



б)

Тучные клетки (а) и макрофаги (б) в респираторном отделе лёгкого животного на 4 месяце эксперимента. Красная стрелка – тучная клетка, зеленая стрелка – альвеолярный макрофаг, розовая стрелка – интерстициальный макрофаг. Окраска: толуидиновым синим (а), иммуногистохимическая реакция на CD68 с подкраской гематоксилином (б). Об.40, ок.10

Динамика показателей объектов морфометрии в респираторном отделе лёгкого после введения наночастиц диоксида кремния

Клетки	21 сут.		2 мес.		4 мес.	
	Контр. (физ. р-р)	НЧК	Контр. (физ. р-р)	НЧК	Контр. (физ. р-р)	НЧК
Макрофаги альвеолярные	$6 \pm 0,5$	$8 \pm 0,7$	7 ± 2	8 ± 1	5 ± 1	10 ± 1^a $p = 0,004942$
Макрофаги интерстициальные	5 ± 1	$9 \pm 0,8^a$ $p = 0,001264$	7 ± 2	9 ± 1	4 ± 2	$6 \pm 0,7^a$ $p = 0,006777$
Тучные клетки	$2 \pm 0,4$	$2 \pm 0,3$	$4 \pm 0,4$	$1 \pm 0,2$	$3 \pm 0,8$	$2 \pm 0,3$

Примечание. ^a – показатели статистически значимо отличаются от группы контроля при $p < 0,05$.

Через 2 месяца эксперимента визуальное перегородки утолщены за счёт умеренного клеточного инфильтрата. Число иМФ и аМФ незначимо повышено по сравнению с показателями в группе К, число ТК незначимо снижается до $1 \pm 0,2$ клетки в поле зрения (таблица).

Через 4 месяца после введения НЧДК повышается содержание клеток в межальвеолярных перегородках, число иМФ значимо увеличивается до 150% и составляет $6 \pm 0,7$ клеток в поле зрения. Численность аМФ значимо повышается до 200% и составляет 10 ± 1 клеток в поле зрения. ТК не реагируют на введение НЧДК, их число остаётся в пределах контрольных значений (таблица).

Проведенное исследование показало увеличение числа макрофагов на 21 сутки эксперимента как в интерстиции, так и в альвеолах, что свидетельствует о распространении гематогенно вводимых НЧДК размером 12 нм за пределы капилляра. Очевидно, что НЧДК пересекают как стенку капилляра, попадая в интерстиций, так и компоненты азрогематического барьера, оказываясь в просвете альвеол. При этом наблюдаемая макрофагальная реакция свидетельствует об интернализации дисперсных нанообъектов в макрофаги. Логично предположить, что интернализация нанообъектов происходит и в эндотелий, и в фибробласты, и в альвеоциты. Но только макрофаги, являясь важнейшим звеном в системе местного иммунитета и обеспечивая неспецифический и специфический иммунные ответы, остро реагируют на интернализацию НЧДК, что объясняется необходимостью элиминации инородного материала. Установлено, что инородные тела не остаются в тканях постоянно. В физиологической среде, после распределения НЧДК в тканях, происходит их распад на сроках от 2 недель до 3 месяцев, что зависит от размеров, степени пористости частиц и др. факторов [5].

Механизмы клеточных изменений на молекулярном уровне в ответ на интернализацию НЧДК представлены в современных работах на клеточных культурах. Так, показано, что при гидролизе ортокремниевой кислоты образующиеся ионы H^+ и H_3SiO_4 закисляют внутриклеточную среду, что стимулирует синтез белка криопирин (NLRP3), который, в свою очередь, запускает воспалительную реакцию [6]. Ключевыми медиаторами воспаления при этом являются интерлейкины IL-1 β , IL-6, провоспалительный цитокин CXCL8 и фактор транскрипции, контролирующей экспрессию генов иммунного ответа и апоптоза [7]. Появились данные, что развитию/

поддержанию реактивного воспаления в ответ на внутриклеточную интернализацию НЧДК способствует повреждение мембранных структур клетки, развивающееся по механизму окислительного стресса [8].

В ходе настоящего исследования *in vivo* показано увеличение и поддержание численности макрофагального пула в легочной ткани на протяжении 4 месяцев эксперимента. Полученные данные свидетельствуют о хроническом асептическом воспалении, представленном макрофагальной инфильтрацией, вызванной интернализацией НЧДК в макрофаги, биодеградацией НЧДК внутри макрофагов, что, в свою очередь, вероятно, приводит к синтезу криопирин – триггера воспаления.

Согласно литературным данным число иМФ приблизительно соответствует числу аМФ [9]. Результаты настоящего исследования соответствуют этим данным и на всех сроках эксперимента наблюдаются приблизительно одинаковые контрольные значения числа иМФ и аМФ. В группах с внутривенным введением НЧДК на 21 сутки и 2 месяца эксперимента числа иМФ и аМФ возрастают одновременно и также приблизительно равны. Однако через 4 месяца в экспериментальной группе число аМФ значимо выше контрольных значений и превосходит число иМФ. В работе Мильто [10] показано, что после парентерального введения наноразмерных частиц магнетита в лёгких у крыс альвеолярные иммунопозитивные макрофаги доминируют над интерстициальными. Однако полученные данные автор не объясняет. Возможно, активация аМФ на данном сроке эксперимента происходит не без участия компонентов сурфактанта, один из белков которого – сурфактантный белок D (SP-D) – регулирует деятельность аМФ [11].

Под действием провоспалительных и антипатогенных факторов в макрофагах активируется индуцибельная NO-синтаза (iNOS), способствующая образованию окиси азота (NO) и длительному поддержанию его высокой концентрации во внеклеточной среде. При этом NO в высокой концентрации приводит к нитрозилированию сурфактантного белка SP-D и изменению его роли с ингибитора активности аМФ на роль активатора воспалительной реакции [12]. В данном случае наличие хронического асептического воспаления, сохраняющегося на протяжении всего эксперимента (прежде всего в интерстиции респираторного отдела), очевидно, приводит к повышенной продукции NO, что, в свою очередь, ведёт к нитрозилированию белка SP-D, повышающего функциональную активность макро-

фагов в альвеолах, а они, синтезируя провоспалительные цитокины, продолжают привлекать в альвеолы все новые макрофаги. Однако остаётся неизвестным, было ли повышение пула аМФ в период между 2 и 4 месяцами эксперимента.

В ходе настоящего исследования показано, что ТК не реагируют на парентеральное введение НЧДК сферической формы размером 12 нм, не мигрируют в межальвеолярные перегородки и их число перибронхиально и перивазально не увеличивается, что является положительным признаком. Хорошо известно, что именно макрофаги первыми реагируют на экзогенный фактор (в данном случае НЧДК) и становятся инициаторами клеточных реакций, в результате которых происходит перестройка соединительной ткани [13]. Цитокины, прежде всего ИЛ-1, секретируемые макрофагами, провоцируют миграцию ТК и их IgE-независимую дегрануляцию. Показано, что триптаза и химаза гранул ТК стимулируют секреторную активность фибробластов и их пролиферацию [14]. Таким образом, секреторная активность макрофагов и ТК приводит к ремоделированию соединительной ткани в органах. В настоящей работе обнаружено, что ТК нечувствительны к НЧДК, не вовлекаются в межклеточные взаимодействия, и на протяжении 4 месяцев эксперимента не наблюдалось соединительнотканного ремоделирования в интерстиции респираторного отдела и морфологических признаков, характерных для силикоза лёгких. Кроме того, следует отметить, что в реакцию местного иммунитета не вовлекаются и клетки лимфоидного ряда, нейтрофилы и эозинофилы, что также не способствует усилению воспалительного процесса в тканях лёгких.

По итогам проведенного экспериментального исследования установлено, что внутривенное введение суспензии НЧДК (0,1 мг/кг) сферической формы размером 12 нм приводит к развитию хронического асептического воспаления, проявляющегося в увеличении пула иМФ в межальвеолярных перегородках и аМФ в просвете альвеол на протяжении 4 месяцев эксперимента. Полученные результаты указывают на необходимость дальнейшего изучения влияния НЧДК на популяции макрофагов и тучных клеток в респираторном отделе лёгких на более длительных сроках.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № госрегистрации АААА-А18-18102590054-0.

Список литературы

1. Подколотная О.А., Игнатъева Е.В., Подколотный Н.Л., Колчанов Н.А. Пути поступления наночастиц в организм млекопитающих, их биосовместимость и клеточные эффекты // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. № 1. С. 3–15.
2. Ivanov S., Zhuravsky S., Yukina G., Tomson V., Korablev D., Galagudza M. In vivo toxicity of intravenously administered silica and silicon nanoparticles. *Materials*. 2012. vol. 5. no. 10. P. 1873–1889.
3. Braakhuis H.M., Park M.V., Gosens I., De Jong W.H., Cassee F.R. Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Particle and Fibre Toxicology*. 2014. vol. 11. P. 18.
4. Leclerc L., Rima W., Boudard D., Pourchez J., Forest V., Bin V., Mowat P., Perriat P., Tillement O., Grosseau P., Bernache-Assollant D., Cottier M. Size of submicrometric and nanometric particles affect cellular uptake and biological activity of macrophages in vitro. *Inhalation Toxicology*. 2012. vol. 24. no. 9. P. 580–588.
5. Croissant J.G., Brinker C.J. Biodegradable silica-based nanoparticles: dissolution kinetics and selective bond cleavage. *Enzymes*. 2018. vol. 43. P. 181–214.
6. Yang M., Jing L., Wang J., Yu Y., Cao L., Zhang L., Zhou X., Sun Z. Macrophages participate in local and systemic inflammation induced by amorphous silica nanoparticles through intratracheal instillation. *Int. J. Nanomedicine*. 2016. vol. 11. P. 6217–6228.
7. Rabolli V., Lison D., Huaux F. The complex cascade of cellular events governing inflammasome activation and IL-1 β processing in response to inhaled particles. *Part Fibre Toxicol.* 2016. vol. 13. no. 1. P. 40.
8. Özgür M.E., Ulu A., Özcan İ., Balcioğlu S., Ateş B., Köytepe S. Investigation of toxic effects of amorphous SiO₂ nanoparticles on motility and oxidative stress markers in rainbow trout sperm cells. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2019. vol. 26. no. 15. P. 15641–15652.
9. Lambrecht B.N. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity*. 2006. vol. 24. no. 4. P. 366–368.
10. Мильто И.В. Макрофаги печени, лёгких, почек и селезёнки у крыс после внутривенного введения модифицированных наноразмерных частиц магнетита // Морфология. 2014. Т. 146. № 5. С. 40–45.
11. LeVine A.M., Whitsett J.A., Gwozdz J.A., Richardson T.R., Fisher J.H., Burhans M.S., Korfhagen T.R. Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung. *J. Immunol.* 2000. vol. 165. no. 7. P. 3934–3940.
12. Guo Z., Shao L., Du Q., Park K.S., Geller D.A. Identification of classic cytokine-induced enhancer upstream in the human iNOS promoter. *The FASEB J.* 2007. vol. 21. no. 2. P.535–542.
13. Shkurupiy V.A., Kim L.B., Potapova O.V., Cherdantseva L.A., Putyatina A.N., Nikonova I.K. Fibrogenesis in granulomas and lung interstitium in tuberculous inflammation in mice. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014. vol. 156. no. 6. P. 731–735.
14. Kosanovic D., Dahal B.K., Wygrecka M. Reiss I., Günther A., Ghofrani H.A., Weissmann N., Grimminger F., Seeger W., Schermuly R.T., Banat G.A. Mast cell chymase: an indispensable instrument in the pathological symphony of idiopathic pulmonary fibrosis? *Histol. Histopathol.* 2013. vol. 28. no. 6. P. 691–699.