

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПУЛА МАКРОФАГОВ В РЕСПИРАТОРНОМ ОТДЕЛЕ ЛЕГКИХ КРЫС ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ ПОРИСТОГО КРЕМНИЯ

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

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

В настоящее время одним из самых привлекательных наноматериалов для контролируемого и локализованного высвобождения лекарственных и диагностических средств считается пористый кремний. Благодаря своим свойствам наночастицы пористого кремния (НЧПК) имеют предпосылки для широкого использования в разных областях медицины, в частности в тераностике и фотодинамической терапии, иммунотерапии, генной терапии, вакцинологии. С целью оценки потенциальных рисков для здоровья необходимы более обширные исследования *in vivo* особенностей реакции различных органов на системное введение НЧПК разного размера. В связи с этим целью настоящего исследования является морфометрический анализ пула макрофагов в респираторном отделе легких крыс через 2 месяца после однократного внутривенного введения пористого кремния размерами 60–80 нм, 250–300 нм и 500–600 нм (2 мг/кг, 1 мл). Показано, что число альвеолярных макрофагов (аМФ) повышается только в экспериментальной группе с применением НЧПК размером 60–80 нм, однако отличие их числа в сравнении с контролем статистически не значимо. Число интерстициальных макрофагов (иМФ) значимо возрастает при введении НЧПК размером 250–300 нм и 500–600 нм. На основании этого сделан вывод, что однократное внутривенное введение НЧПК размерами 250–300 нм и 500–600 нм вызывает в интерстиции респираторного отдела легкого асептическое воспаление без признаков соединительнотканного ремоделирования. Однократное внутривенное введение НЧПК размером 60–80 нм не приводит к значимым изменениям в пуле как иМФ, так и аМФ. Полученные данные свидетельствуют о необходимости учитывать размер частицы-носителя при выборе систем направленной лекарственной доставки.

Ключевые слова: легкие крысы, наночастицы пористого кремния, CD68⁺ клетки, асептическое воспаление, соединительнотканное ремоделирование

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE MACROPHAGE POOL IN A LUNGS' RESPIRATORY COMPARTMENT OF RATS WITH A ONE-TIME INTRAVENOUS ADMINISTRATION OF SUBMICRON PARTICLES OF POROUS SILICON

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

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

Nowadays porous silicon is considered as one of the most usable nanomaterial for controlled and localized effect of drugs and diagnostic agents. Due to their properties, porous silicon nanoparticles (PSNPs) have good perspectives for widespread use in various fields of medicine including theranostics and photodynamic therapy, immunotherapy, gene therapy, and vaccination. Nevertheless there is a need of more *in vivo* studies of the various organs response to systemic administration of different-size PSNPs. So the aim of the present study is a morphometric analysis of the macrophages pool in a lungs' respiratory compartment of rats in 2 months after a one-time intravenous administration of porous silicon with sizes of 60–80 nm, 250–300 nm and 500–600 nm (2 mg/kg, 1 ml). The number of alveolar macrophages (aMP) increases only in the experimental group of PSNPs with a size of 60–80 nm, but the difference of their number is statistically insignificant when compared with the control. The number of interstitial macrophages (iMP) increases significantly with the administration of PSNPs with sizes of 250–300 nm and 500–600 nm. Thus a one-time intravenous administration of PSNPs with sizes of 250–300 nm and 500–600 nm causes aseptic inflammation in the interstitium of the lungs' respiratory compartment without fibrosis remodeling. PSNPs with a size of 60–80 nm do not lead to significant changes in the pool of both iMP and aMP. These data indicate the need of paying attention on the size of the matrix carrier due to the choosing of targeted drug delivery systems.

Keywords: rat lungs, porous silicon nanoparticles, CD68⁺ cells, aseptic inflammation, connective-tissue remodeling

В настоящее время одним из самых привлекательных наноматериалов для контролируемого и локализованного высвобождения лекарственных и диагностических средств считается пористый кремний [1]. Такие его свойства, как высокая биосовместимость и биоразлагаемость до малотоксичной кремниевой кислоты, возможность настраивания необходимых размеров пор и обработки защитными покрытиями, спо-

собность к конъюгации с различными веществами, большая удельная поверхность, обеспечивающая их лекарственную нагрузку, а также наличие собственной фотолуминесценции, обусловили предпосылки для широкого использования наночастиц пористого кремния (НЧПК) в разных областях медицины, в частности в тераностике и фотодинамической терапии [2], иммунотерапии [3], генной терапии [4], в вакцино-

логии [5] и др. Утверждается, что наиболее подходящими являются наночастицы размерами свыше 50 нм, поскольку они могут избежать почечной фильтрации, что приводит к увеличению времени их циркуляции в кровотоке и, следовательно, позволяет более эффективно воздействовать на органы-мишени [6]. В то же время очевидно, что вводимые системно наночастицы разносятся кровью в различные органы и вызывают в них активацию моноклеарной фагоцитарной системы, а значит, развитие непреднамеренной острой или хронической интоксикации. Учитывая бесспорные достоинства НЧПК и большие надежды, возлагаемые на них, необходимы глубокие исследования *in vivo* особенностей реакции различных органов на системное введение НЧПК разного размера, чтобы оценить потенциальные риски для здоровья и их надежность для клинической практики.

В связи с этим целью настоящего исследования является морфометрический анализ пула макрофагов в респираторном отделе крыс через 2 месяца после однократного внутривенного введения пористого кремния размерами 60–80 нм, 250–300 нм и 500–600 нм.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 20 самцах крыс стока Wistar, соматически здоровых, массой 220–250 г (ФГУП «ПЛЖ «Рапполово», РАН, Россия), содержащихся в стандартных условиях вивария конвенциональной категории. Объектом исследования явились НЧПК, полученные методом электрохимического анодного растворения кремния с последующей обработкой ультразвуком [7].

Животные были разделены на 4 группы: 1) контроль (n=5) – с введением физиологического раствора (К); 2) экспериментальная группа I (n=5) – с введением суспензии НЧПК размером 60–80 нм (ЭГ I); 3) экспериментальная группа II (n=5) – с введением суспензии НЧПК размером 250–300 нм (ЭГ II); 4) экспериментальная группа III (n=5) – с введением суспензии НЧПК размером 500–600 нм (ЭГ III). Суспензии НЧПК в концентрации 2 мг/мл вводили однократно в хвостовую вену в объеме 1 мл. Манипуляции с животными проводили в условиях анестезии препаратом Золетил (6 мг/кг), вводимым внутривенно. При экспериментальных исследованиях руководствовались приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и рекомендациями Этического комитета ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава

России. Забор материала осуществляли через 2 месяца после введения НЧПК. Для получения сопоставимых результатов образцы обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Получали фронтальный срез доли левого легкого, растянутого при фиксации 10%-ным формалином (рН 7,4). Для гистологического анализа использовали парафиновые срезы толщиной 5 мкм, изготовленные с помощью микротомы Accu-Cut SRT 200 (Sakura, Япония), окрашенные гематоксилином и эозином и по методу Маллори («Биовитрум», Россия). Содержание соединительной ткани в респираторном отделе легкого оценивали визуально.

Макрофаги выявляли при помощи первичных моноклональных мышечных антител Anti-CD68 antibody (ab 31630) (Abcam) при разведении 1:1000 и инкубации в течение 60 мин при комнатной температуре. Для выявления связавшихся первичных антител использовали мультимерную безбиотинную систему (D&A, Reveal-Biotin-Free Polyvalent DAB, Spring Bioscience Corporation, USA). Подсчет альвеолярных и интерстициальных макрофагов (аМФ и иМФ соответственно) производили на цифровых изображениях срезов респираторного отдела легкого, 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 легкого и в альвеолах в 20 полях зрения, площадью 0,33x0,25 мм каждое поле, при объективе x10, окуляре x40.

Статистический анализ проводили при помощи программы IBM SPSS Statistica 23 с использованием критерия Колмогорова–Смирнова и непараметрического U-критерия Манна–Уитни при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы данных из каждой выборки и среднего расстояния от медианы до 25/75 квартиля.

Результаты исследования и их обсуждение

Во всех экспериментальных группах макроскопическая картина легких без патологических изменений и соответствует контрольным значениям. Микроскопически архитектура бронхов и респираторного отдела сохранена.

В ЭГ I число иМФ и аМФ незначимо возрастает по сравнению с показателями в группе К, размеры макрофагов визуально не увеличены. В просвете альвеол содержимого нет, в интерстиции иМФ лежат преи-

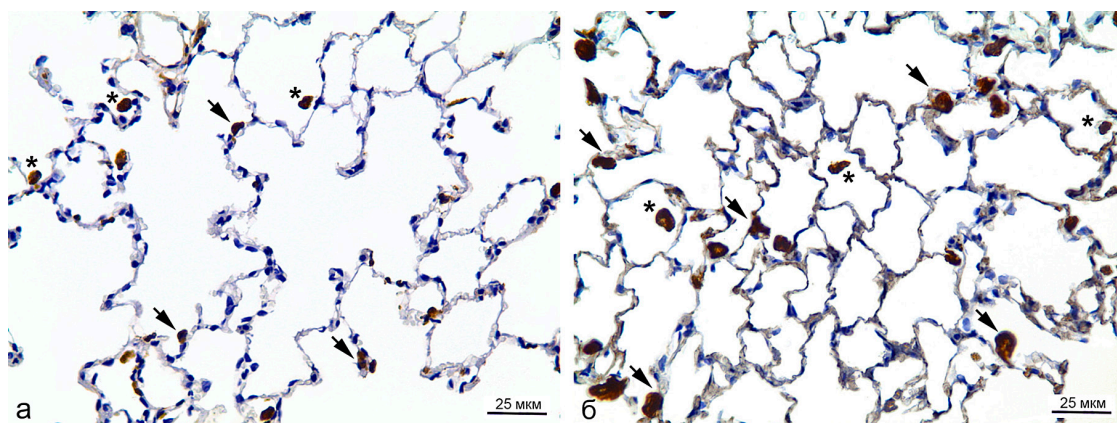
мущественно поодиночке, определяется незначительное число лимфоцитов, толщина интерстиция и содержание соединительной ткани визуально не изменены.

В ЭГII и ЭГIII в альвеолах визуализируются одиночные аМФ, их число соответствует контрольным значениям, размеры не увеличены. В интерстиции иМФ лежат преимущественно поодиночке, но определяются редкие очаговые скопления (2–3 иМФ), визуально толщина межальвеолярной перегородки не изменена и содержание соединительной ткани не увеличено. Число иМФ возрастает в ЭГII до 160% по сравнению с контрольным значением: 8 ± 3 клеток в поле зрения против 5 ± 4 ($p=0,001$), и до 220% в ЭГIII: 11 ± 6 клеток в поле зрения против 5 ± 4 ($p=0,001$). Также в ЭГII и ЭГIII визу-

лизируется увеличение размеров иМФ по сравнению с группой К и ЭГI. При этом на всем сроке эксперимента не наблюдается увеличения клеточного пула тучных клеток, лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов.

Настоящее исследование показало, что через 2 месяца число иМФ увеличивается во всех экспериментальных группах, а в ЭГII и ЭГIII увеличивается значимо.

Макрофагальная реакция в интерстиции респираторного отдела легкого свидетельствует, вероятно, о том, что НЧПК использованных в настоящем исследовании размеров не подвергаются почечной фильтрации и задерживаются в организме, в нашем случае в легких, на неопределенный срок, что подтверждают имеющиеся в литературе сведения [6].



Респираторный отдел легкого контрольного животного (а) и с введением суспензии НЧПК размером 500–600 нм (б). Звездочка – альвеолярный макрофаг, стрелка – интерстициальный макрофаг. Иммуногистохимическое выявление CD68+ клеток с подкраской срезов гематоксилином. Ок.10, об.40

Динамика показателей объектов морфометрии в респираторном отделе легкого после введения наночастиц пористого кремния различного размера

Клетки	Экспериментальная группа / Размер НЧПК	Число макрофагов
аМФ	Группа К (физраствор)	5 ± 3
	ЭГI / 60–80 нм	6 ± 3 $p=0,482$
	ЭГII / 250–300 нм	5 ± 2 $p=0,807$
	ЭГIII / 500–600 нм	5 ± 3 $p=0,898$
иМФ	Группа К (физраствор)	5 ± 4
	ЭГI / 60–80 нм	7 ± 3 $p=0,095$
	ЭГII / 250–300 нм	8 ± 3^a $p=0,001$
	ЭГIII / 500–600 нм	11 ± 6^a $p=0,001$

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

Не менее интересен факт явного увеличения размеров иМФ в экспериментах с введением частиц 250–300 нм и 500–600 нм. Данное явление связано, скорее всего, с различиями в скорости биодеградации НЧПК: внутриклеточная концентрация частиц размером 60–80 нм за 2 месяца эксперимента понижается быстрее, чем концентрация частиц, размеры которых приближаются к микрометровой величине.

Ранее авторы показали, что НЧПК исследуемых размеров интернализируются в печени различными механизмами. Элиминационная функция клеток Купфера ярко проявляется при введении частиц размерами 250–300 нм и 500–600 нм, что приводит к формированию многочисленных мелких гранул в печени [8]. В настоящем исследовании значимое увеличение иМФ в интерстиции легкого также вызывается НЧПК данных размеров. Образование крупных и немногочисленных гранул в печени при введении НЧПК размером 60–80 нм авторы связывали с интернализацией по механизму диффузии [8, 9]. Очевидно, по такому же механизму осуществляется интернализация этих частиц и в интерстиции легкого, что косвенно подтверждается незначительным повышением числа аМФ в ЭГЛ. Возможно, часть НЧПК размером 60–80 нм при длительной циркуляции в организме все-таки диффундируют через аэрогематический барьер. В то же время ни в ЭГП, ни в ЭГШ не происходит увеличения числа аМФ, что, как предполагается авторами, свидетельствует о невозможности частиц таких размеров проникать через аэрогематический барьер.

В предыдущих работах с введением наночастиц диоксида кремния размерами 7, 12 и 34 нм было показано, что в интерстиции легкого развивается асептическое воспаление, представленное только пролиферирующими иМФ, без участия тучных клеток, лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов. При этом разрастания соединительной ткани даже на поздних сроках эксперимента авторы не обнаружили [10, 11]. Схожая картина наблюдается и в настоящем исследовании: асептическое воспаление в интерстиции легкого развивается только за счет увеличения числа иМФ. Соединительнотканного ремоделирования паренхимы легкого не происходит ни в одной экспериментальной группе.

Заключение

Однократное внутривенное введение НЧПК микрометровой величины 250–300 нм и 500–600 нм вызывает в интерстиции респираторного отдела легкого асепти-

ческое воспаление без признаков соединительнотканного ремоделирования. Введение НЧПК размером 60–80 нм не приводит к значимым изменениям в пуле как иМФ, так и аМФ. Полученные данные свидетельствуют о необходимости учитывать размер частицы-носителя при выборе систем направленной лекарственной доставки.

Принятые сокращения: НЧПК – наночастицы пористого кремния, аМФ – альвеолярные макрофаги, иМФ – интерстициальные макрофаги.

Список литературы

1. Martín-Palma R.J., Hernández-Montelongo J., Torres-Costa V., Manso-Silván M., Muñoz-Noval Á. Nanostructured porous silicon-mediated drug delivery // *Expert Opin Drug Deliv.* 2014. Vol. 11. No. 8. P. 1273-83.
2. Kumeria T., McInnes S.J.P., Maher S., Santos A. Porous silicon for drug delivery applications and theranostics: recent advances, critical review and perspectives // *Expert Opin Drug Deliv.* 2017. Vol. 14. No. 12. P. 1407-1422.
3. Kim B., Yang Q., Chan L.W., Bhatia S.N., Ruoslahti E., Sailor M.J. Fusogenic porous silicon nanoparticles as a broad-spectrum immunotherapy against bacterial infections // *Nanoscale Horiz.* 2021. Vol. 6. No. 4. P. 330-340.
4. Kim B., Sun S., Varner J.A., Howell S.B., Ruoslahti E., Sailor M.J. Securing the Payload, Finding the Cell, and Avoiding the Endosome: Peptide-Targeted, Fusogenic Porous Silicon Nanoparticles for Delivery of siRNA // *Adv Mater.* 2019. Vol. 31. No. 35. P. e1902952.
5. Ding C., Yang C., Cheng T., Wang X., Wang Q., He R., Sang S., Zhu K., Xu D., Wang J., Liu X., Zhang X. Macrophage-biomimetic porous Se@SiO₂ nanocomposites for dual modal immunotherapy against inflammatory osteolysis // *J. Nanobiotechnology.* 2021. Vol. 19. No. 1. P. 382.
6. Park J.-H., Gu L., von Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications // *Nat. Mater.* 2009. Vol. 8. No. 4. P. 331-336.
7. Спивак Ю.М., Белорус А.О., Паневин А.А., Журавский С.Г., Мошников В.А., Беспалова К., Сомов П.А., Жуков Ю.М., Комолов А.С., Чистякова Л.В., Григорьева Н.Ю. Пористый кремний как наноматериал для дисперсных транспортных систем направленной лекарственной доставки ко внутреннему уху // *Журнал технической физики.* 2018. № 9. С. 1394-1403.
8. Журавский С.Г., Юкина Г.Ю., Сухорукова Е.Г., Крыжановская Е.А., Половников И.В., Белорус А.О., Спивак Ю.М., Галагудза М.М. Характер гранулёобразования в печени крыс как отражение механизма интернализации субмикронных частиц пористого кремния // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023. № 9. С. 386-390.
9. Rosenholm J.M., Mamaeva V., Sahlgren C., Lindén M. Nanoparticles in targeted cancer therapy: mesoporous silica nanoparticles entering preclinical development stage // *Nanomedicine (Lond).* 2012. Vol. 7. No. 1. P. 111-120.
10. Юкина Г.Ю., Половников И.В., Сухорукова Е.Г., Журавский С.Г., Галагудза М.М. Морфологический анализ респираторного отдела лёгких крыс после парентерального введения наночастиц диоксида кремния // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2020. № 7. С. 112-117.
11. Юкина Г.Ю., Сухорукова Е.Г., Половников И.В., Крыжановская Е.А., Журавский С.Г. Макрофаги респираторного отдела легких крыс после однократного парентерального введения наночастиц диоксида кремния различного размера // *Журнал анатомии и гистопатологии.* 2022. № 3. С. 114-117.