

УДК [611.233+661.718.5]:612.118.24

БРОНХИОЛЯРНЫЕ ЭКЗОКРИНОЦИТЫ (БУЛАВОВИДНЫЕ КЛЕТКИ) В ЛЕГКИХ КРЫС ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ РАЗЛИЧНОГО РАЗМЕРА

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

ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург,
e-mail: len48@inbox.ru

В настоящее время активно изучаются патологические изменения в гистофизиологии легких при введении в организм различными путями наночастиц диоксида кремния (НЧДК) разного размера. Однако следует заметить, что особенности изменений структурной организации и численности бронхиолярных экзокриноцитов (БЭ) при таком воздействии не изучены вовсе, в то время как эти клетки являются многофункциональными и их роль чрезвычайно важна. В связи с этим целью настоящего исследования является анализ морфофункциональной реорганизации и динамики морфометрических показателей БЭ в легких крыс в течение 6 месяцев после однократного парентерального введения НЧДК трех размерных категорий. На самцах крыс стока Wistar (n=80) на 21-е сутки, через 2, 4 и 6 месяцев гистологическим и морфометрическим методами показана реакция БЭ на однократное парентеральное введение НЧДК размером 7 нм, 12 нм и 34 нм. Морфометрическое исследование включало подсчет относительного числа БЭ на 1000 мкм эпителия, определение площади клетки ($S_{\text{кл}}$) и площади ядра ($S_{\text{я}}$). Полученные данные использовали для расчета площади цитоплазмы ($S_{\text{ц}}$) по формуле: $S_{\text{ц}} = S_{\text{кл}} - S_{\text{я}}$ и ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) по формуле: $\text{ЯЦО} = S_{\text{я}} / S_{\text{ц}}$. Морфометрический анализ показал, что однократное парентеральное введение НЧДК размером 7 нм приводит к существенному долгосрочному снижению синтетической и секреторной функций БЭ, в то время как НЧДК размером 12 нм и 34 нм – к краткосрочному снижению функциональной активности этих клеток. При этом ни в одной группе на всем протяжении эксперимента не меняется относительное число БЭ.

Ключевые слова: терминальные бронхиолы, респираторные бронхиолы, наночастицы диоксида кремния, бронхиолярные экзокриноциты, булавовидные клетки, клетки Клара, макрофаги

CLUB CELLS IN THE LUNGS OF RATS AFTER THE SINGLE PARENTERAL ADMINISTRATION OF SILICON DIOXIDE NANOPARTICLES OF DIFFERENT SIZES

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

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

Currently, pathological changes in the lung histophysiology after the different-way administration of silicon dioxide nanoparticles (SDNP) of different sizes are studied actively. Herewith, it should be noted that peculiarities of changes in the structural organization and number of club cells (CCs) have not been studied at all while using them, though these cells are multifunctional and their role is extremely important. Therefore, the aim of the present study is to analyze the morphofunctional reorganization and dynamics of morphometric indices of CCs in rat lung for 6 months after a single parenteral injection of SDNP of three categories of size. In male Wistar rats (n=80), the response of CCs was shown by histological method at 21 days, 2, 4 and 6 months. Morphometric study included counting of relative number of CCs per 1000 mcm of epithelium, determination of cell area (S_{c}) and nucleus area (S_{n}). The obtained data were used to calculate the cytoplasmic area (S_{cyt}) using the formula: $S_{\text{cyt}} = S_{\text{c}} - S_{\text{n}}$; and nuclear-cytoplasmic ratio (NCR) by the formula: $S_{\text{n}} / S_{\text{cyt}}$. Morphometric analysis showed that a single parenteral injection of 7-nm SDNP results in a significant long-term decrease in the synthetic and secretory function of CCs, while 12-nm and 34-nm SDNP results in a short-term decrease in the functional activity of these cells. At the same time, the relative number of CCs did not change in either group throughout the experiment.

Keywords: terminal bronchioles, respiratory bronchioles, silicon dioxide nanoparticles, club cells, Clara cells, macrophages

Бронхиолярные экзокриноциты (БЭ), также известные как булавовидные клетки (club cells, CCs-клетки) или клетки Клара, – это безреснитчатые кубические или цилиндрические эпителиальные клетки, выстилающие самые дистальные отделы воздухоносных путей и респираторные бронхиолы. У крыс они значительно выступают в просвет бронхиол своей апикальной частью, напоминая булавку. В норме в общей популяции клеток бронхиолярного эпителия у крысы количество БЭ в терминальных бронхиолах в два раза меньше,

чем в респираторных бронхиолах, а в проксимальных воздушных путях они практически отсутствуют [1].

На сегодняшний день выяснено, что БЭ являются многофункциональными клетками, хотя окончательно их функции не определены, поскольку не известен полностью состав секрета, который они синтезируют и выделяют в просвет бронхиол. Среди установленных функций БЭ следует упомянуть секреторную функцию, а именно их участие в образовании бронхиолярного секрета, благодаря перемещению которого

осуществляется бронхиоларный мукоцилиарный клиренс. Помимо этого, БЭ секретируют компоненты сурфактанта, а также различные белки, ингибирующие выделение лейкоцитами провоспалительных веществ и хемотаксис фибробластов [2, 3, 4]. Не менее важной функцией БЭ является обеспечение метаболизма канцерогенных веществ и ксенобиотиков, что, по выражению В.Л. Горячкиной, позволяет считать БЭ своего рода цитоэкологическим форпостом, защищающим респираторный отдел легкого от загрязнения [5]. Ну и, пожалуй, еще одна их значимая функция – участие в качестве стволовых клеток в обновлении собственной популяции, а также популяции реснитчатых клеток, как в нормальных физиологических условиях, так и при патологических воздействиях на эпителий бронхов [6, 7].

В настоящее время одним из наиболее активно изучаемых патологических воздействий на гистофизиологию легких является введение в организм различными путями наночастиц диоксида кремния (НЧДК) разного размера [8, 9, 10]. Однако следует заметить, что особенности изменений структурной организации и численности БЭ при их воздействии не изучены вовсе. В связи с этим **целью** настоящего исследования является анализ морфофункциональной реорганизации и динамики морфометрических показателей БЭ в легком крыс в течение 6 месяцев после однократного парентерального введения НЧДК размером 7, 12 и 34 нм.

Материал и методы исследования

Исследование проведено на 80 самцах крыс стока Wistar, соматически здоровых, массой 220–250 г (ФГУП «ПЛЖ «Рапполово», Россия), содержавшихся в стандартных условиях вивария конвенциональной категории. Животные были разделены на 4 группы: 1) контрольная (n=20) – с введением 1 мл физиологического раствора (К); 2) экспериментальная группа 1 (n=20) – с введением 1 мл суспензии НЧДК размером 7 нм (официальный препарат «Полисorb-МП», АО «Полисorb», Россия) в физиологическом растворе (ЭГ1); 3) экспериментальная группа 2 (n=20) с введением 1 мл суспензии НЧДК размером 12 нм («Аэросил-200», Россия) (ЭГ2); 4) экспериментальная группа 3 (n=20) – с введением 1 мл суспензии НЧДК размером 34 нм («Белая сажа БС-100», ООО «Товесорб», Россия) в физиологическом растворе (ЭГ3). Во всех экспериментальных случаях суспензию НЧДК вводили однократно из расчета 7 мг/кг массы тела животного в концентрации 2 мг/мл в хво-

стовую вену в объеме 1 мл. Для проведения экспериментов *in vivo* использовались препараты высокой степени чистоты, применяемые в фармацевтической и пищевой промышленности. 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. Материал забирали на 21-е сутки, через 2, 4 и 6 месяцев после введения НЧДК, по 5 животных в группе. Для получения сопоставимых результатов образцы обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Получали фронтальный срез доли левого легкого, растянутого при фиксации 10% 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).

Морфологическое исследование проводили при помощи светового микроскопа Leica DM750 (Leica, Германия), цифровой фотокамеры ICC50 (Leica, Германия) и прикладной компьютерной программы анализа изображений ImageScore Color (версия М). Содержание соединительной ткани в респираторном отделе легкого оценивали визуально. На каждом срезе определяли 10 полей зрения, содержащих респираторную или терминальную бронхиолу, в которой проводили измерение длины респираторного эпителия (L_3 , мкм) и подсчет БЭ в этом эпителии ($N_{абс.}$) с дальнейшим пересчетом их числа на 1000 мкм ($N_{отн.}$) по формуле: $N_{отн.} = (N_{абс.} / L_3) \times 1000$. БЭ считали низкопризматические клетки с куполообразной апикальной частью, значительно выступающие в просвет бронхиолы. У 20 БЭ с каждого препарата определяли площадь клетки ($S_{кл.}$, мкм²) и площадь ядра ($S_{я.}$, мкм²). Полученные данные использовали для расчета площади цитоплазмы ($S_{ц.}$, мкм²) по формуле: $S_{ц.} = S_{кл.} - S_{я.}$ и ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) по формуле: $ЯЦО = S_{я.} / S_{ц.}$. Статистическую обработку проводили с использованием стандартного пакета Statistica 7.0 Stat. Soft for Windows по группам. Объем выборки в каждой группе для подсчета относительного числа БЭ – 50 элементов (5 животных в группе, 10 полей зрения с 1 микропрепарата), для под-

счета площади клетки, площади ядра клетки, ЯЦО – 100 элементов (5 животных в группе, 20 клеток с 1 микропрепарата). Распределение данных в каждой группе соответствует нормальному, что подтверждено по W-критерию Шапиро–Уилка с вероятностью ошибки $<0,05$. Для оценки достоверности различий количественных данных между группами экспериментальных животных использовали U-критерий Манна–Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0,01$.

Результаты исследования и их обсуждение

Как у животных группы К, так и у животных всех экспериментальных групп просвет терминальных и респираторных бронхиол чистый, в просвете единичных бронхиол встречаются отдельные редкие макрофаги и слущенные эпителиальные клетки. Однослойный кубический эпителий во всех бронхиолах без изменений, собственная пластинка без признаков воспалительной реакции (рисунок). На всех сроках эксперимента не было обнаружено признаков соединительнотканного ремоделирования слизистой оболочки бронхиол.

В ЭГ1 относительное число БЭ в эпителии соответствует таковому в группе К и не изменяется на всех сроках эксперимента. Однако Скл и Ся значительно снижаются уже на 21-е сутки эксперимента и остаются пониженными на всех экспериментальных сроках, при этом также значительно снижается ЯЦО на 21-е сутки, через 2 и 4 месяца эксперимента. На 6-м месяце эксперимента данный показатель соответствует значению в группе К (таблица, рисунок).

В ЭГ2 и ЭГ3 относительное число БЭ также не изменяется по сравнению с данным показателем в группе К. Скл на всех сроках эксперимента не отличается от контрольных значений (таблица).

Но стоит отметить, что Ся в ЭГ2 и ЭГ3 значительно уменьшается по сравнению с показателями в группе К практически на всех сроках эксперимента. Однако расчет ЯЦО показывает значимое снижение этого показателя в ЭГ2 и ЭГ3 только на 21-е сутки эксперимента (таблица).

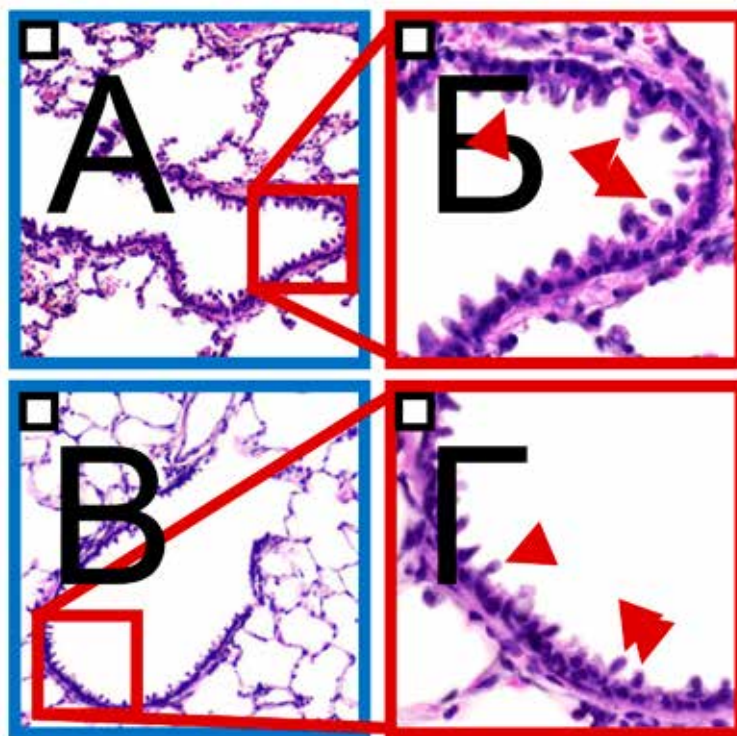
Статистический анализ полученных данных показывает также значимое уменьшение ЯЦО в ЭГ1 относительно данного показателя в ЭГ2 и ЭГ3 на 2-м и 4-м месяце эксперимента.

Динамика показателей объектов морфометрии в терминальных и респираторных бронхиолах после введения наночастиц диоксида кремния различного размера

Показатель	Срок / Группа	Контроль (физраствор)	ЭГ1 (7 нм)	ЭГ2 (12 нм)	ЭГ3 (34 нм)
Относительное число клеток (кл / 1000 мкм)	21-е сутки	12 ± 2	12 ± 1	11 ± 2	14 ± 2
	2 месяца	11 ± 2	12 ± 1	12 ± 2	11 ± 2
	4 месяца	11 ± 0	11 ± 3	12 ± 1	11 ± 0
	6 месяцев	10 ± 2	11 ± 2	10 ± 3	9 ± 3
Площадь клетки (мкм ²)	21-е сутки	2648 ± 492	$1968 \pm 320^*$	1789 ± 120	2279 ± 422
	2 месяца	1802 ± 67	1979 ± 374	2128 ± 452	2053 ± 329
	4 месяца	2119 ± 253	1942 ± 306	1875 ± 147	1750 ± 111
	6 месяцев	2137 ± 67	$1789 \pm 120^*$	1955 ± 59	2128 ± 104
Площадь ядра (мкм ²)	21-е сутки	737 ± 133	$519 \pm 71^*$	$470 \pm 63^*$	$537 \pm 79^*$
	2 месяца	526 ± 47	$437 \pm 68^*$	601 ± 143	556 ± 130
	4 месяца	612 ± 10	$470 \pm 43^*$	$503 \pm 57^*$	$443 \pm 22^*$
	6 месяцев	545 ± 37	470 ± 63	$419 \pm 64^*$	534 ± 35
ЯЦО	21-е сутки	$0,41 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,04^*$	$0,37 \pm 0,04^*$	$0,33 \pm 0,05^*$
	2 месяца	$0,43 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,03^{***}$	$0,40 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,08$
	4 месяца	$0,43 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,03^{***}$	$0,38 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,02$
	6 месяцев	$0,35 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,05$

* – показатели статистически значимо отличаются от таковых в контрольной группе с вероятностью ошибки $p < 0,01$.

** – показатели статистически значимо отличаются от таковых в экспериментальных группах ЭГ2 и ЭГ3 с вероятностью ошибки $p < 0,01$.



*Респираторная бронхиола и альвеолы
Контрольная группа (А, Б); экспериментальная группа (SiO_2 , 7 нм) (В, Г).
Стрелки на бронхиоллярные экзокриноциты.
Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение: (А, В) $\times 100$; (Б, Г) $\times 400$*

Известно, что ЯЦО является важнейшей морфологической характеристикой, с помощью которой оценивается уровень метаболической активности клеток [11]. Анализ полученных данных показал, что в ЭГ1 происходит значимое понижение ЯЦО на всех экспериментальных сроках, кроме 6 месяцев. В то же время в ЭГ2 и ЭГ3 ЯЦО значимо снижено только на 21-е сутки эксперимента. Таким образом, согласно нашим данным, однократное парентеральное введение НЧДК в ЭГ1 приводит к существенному долгосрочному снижению синтетической и секреторной функции БЭ, в то время как в ЭГ2 и ЭГ3 – к краткосрочному снижению функциональной активности. Это свидетельствует о большей токсичности НЧДК меньшего размера, что согласуется с данными об их влиянии на макрофаги с развитием асептического воспаления в интерстиции респираторного отдела [12, 13, 14]. Также полученные данные показали, что ни в одной группе на всем протяжении эксперимента не меняется относительное число БЭ, что указывает на отсутствие массовой гибели БЭ при введении НЧДК всех исследуемых размеров.

Заключение

Нами показано, что однократное парентеральное введение НЧДК размерами 7 нм, 12 нм и 34 нм не приводит к изменению численности БЭ на протяжении 6 месяцев, что свидетельствует, по-видимому, об отсутствии стимуляции НЧДК пролиферативной активности у БЭ. При этом НЧДК 7 нм вызывают наибольшую и долговременную морфофункциональную реорганизацию БЭ в терминальных и респираторных бронхиолах, что, безусловно, доказывает наличие токсического эффекта у НЧДК этого размера. Полученные результаты указывают на необходимость дальнейшего изучения влияния НЧДК различных размеров на популяции разных клеток в легких и на более длительных сроках. Таким образом, невозможно говорить о безопасности парентерального введения НЧДК для тканей легкого, несмотря на отсутствие существенных нарушений структурной организации БЭ и признаков пневмофиброза.

Список сокращений: НЧДК – наночастицы диоксида кремния, ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение, БЭ – бронхиоллярные экзокриноциты.

Список литературы

1. Джадранов Е.С., Ергазина М.Ж., Ибадуллаева Ф.С., Красноштанов А.В., Красноштанов В.К., Жумабаева Ж.К. Структурные особенности легочной ткани некоторых видов лабораторных животных // Вестник Казахского Национального медицинского университета. 2016. № 3. С. 153-156.
2. Романова Л.К., Горячкина В.Л. Цитофизиология бронхиальных клеток легкого – источника «антимедиаторов» воспаления // Архив патологии. 1999. № 2. С. 20-27.
3. Blandell R. The biology of Clara cells – Review paper. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.* 2006. No. 2. P. 307-311.
4. Hu T., Sun F., Yu X., Li Q., Zhao L., Hao W., Han W. CC16-TNF- α negative feedback loop formed between Clara cells and normal airway epithelial cells protects against diesel exhaust particles exposure-induced inflammation. *Aging (Albany NY)*. 2021. Vol. 13. No. 15. P. 19442-19459.
5. Горячкина В.Л., Цомартова Д.А., Черешнева Е.В., Иванова М.Ю., Кузнецов С.Л. Современные представления о гистофизиологии бронхиальных экзокриноцитов // Морфология. 2020. Т. 157. № 1. С. 93-97.
6. Reynolds S.D., Malkinson A.M. Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010. Vol. 42. No. 1. P. 1-4.
7. Целуйко С.С., Намакюнова В.С., Красавина Н.П., Чжоу С.Д., Ли Ц. Идентификация и локализация стволовых клеток в органах дыхательной системы (обзор литературы) // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2014. № 52. С. 121-128.
8. 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. No. 11. P. 6217-6228.
9. Зайцева Н.В., Землянова М.А., Звездин В.Н., Добыш А.А., Гмошинский И.В., Хотимченко С.А. Влияние наночастиц диоксида кремния на морфологию внутренних органов у крыс при пероральном введении // Анализ риска здоровью. 2016. № 4. С. 80-94.
10. Юкина Г.Ю., Половников И.В., Сухорукова Е.Г., Журавский С.Г., Галагудза М.М. Морфологический анализ респираторного отдела легких крыс после парентерального введения наночастиц диоксида кремния // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 170. № 7. С. 112-117.
11. Полякова В.С., Боркина А.Н. Морфофункциональная характеристика бронхиальных экзокриноцитов (клеток Клара) у людей зрелого возраста // Морфология. 2008. Т. 134. № 5. С. 36-39.
12. Kersting M., Olejnik M., Rosenkranz N., Loza K., Breisch M., Rostek A., Westphal G., Bünger J., Ziegler N., Ludwig A., Köller M., Sengstock C., Eppe M. Subtoxic cell responses to silica particles with different size and shape. *Sci Rep.* 2020. Vol. 10. No. 1. P. 21591.
13. Inoue M., Sakamoto K., Suzuki A., Nakai S., Ando A., Shiraki Y., Nakahara Y., Omura M., Enomoto A., Nakase I., Sawada M., Hashimoto N. Size and surface modification of silica nanoparticles affect the severity of lung toxicity by modulating endosomal ROS generation in macrophages. *Part Fibre Toxicol.* 2021. Vol. 18. No. 1. P. 21.
14. 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. Т. 11. № 3. С. 114-117.