

DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-4-85-88

УДК 611.36:546.28

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.03.02 – патологическая анатомия

© Коллектив авторов, 2021



Влияние наночастиц диоксида кремния на морфологию печени крысы при парентеральном введении

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

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Проблема потенциальной безопасности диоксида кремния в виде дисперсных частиц наноразмерной величины сохраняет свою актуальность. В связи с этим для 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*.

Цель работы – изучение морфофункциональных изменений в печени крысы после однократного парентерального введения наночастиц диоксида кремния размером 12 нм в течение 6 мес.

Материал и методы. С помощью общегистологических и иммуногистохимических методов исследована печень крыс после однократного парентерального введения 1 мл наночастиц диоксида кремния в дозе 7 мг/кг массы тела в концентрации 2 мг/мл. Контрольным животным вводили 1 мл физиологического раствора. Материал забирали через 21 сутки, 2, 4 и 6 месяцев и фиксировали в 10% нейтральном формалине.

Результаты. Показано формирование гранул в печени на 21-е сут эксперимента и увеличение числа клеток Купфера. Однако к 2-му мес эксперимента число гранул значительно снижается по сравнению с 21-ми сут эксперимента и продолжает снижаться на последующих сроках. Средний размер гранул уменьшается на 2-м мес эксперимента и на последующих сроках эксперимента не изменяется. Через 6 мес эксперимента морфофункциональное состояние печени характеризуется незначительно выраженным асептическим воспалением.

Заключение. Однократное парентеральное введение наночастиц диоксида кремния вызывает выраженное асептическое воспаление печени, уменьшающееся к 6-му мес эксперимента. На всех сроках эксперимента не наблюдается соединительнотканного ремоделирования в печени.

Ключевые слова: печень, макрофагальные гранулемы, наночастицы диоксида кремния.

Effect of Silicon Dioxide Nanoparticles on Liver Morphology of Rats in Parenteral Administration

© G. Yu. Yukina*, E. G. Sukhorukova, I. V. Polovnikov, E. A. Kryzhanovskaya, 2021

First Pavlov State Medical University of St.-Petersburg, St.-Petersburg, Russia

The issue of the potential safety of silicon dioxide nanoparticles (SDNPs) remains relevant. In this connection, in order to use the unique capabilities of silicon nanostructures for biomedical purposes, as well as to level their toxic effects, a detailed study of these nanoparticles interaction with cells and tissues *in vivo* is required.

The aim of the research is to reveal morphofunctional changes in a rat's liver after a single parenteral administration of 12 nm silicon dioxide nanoparticles for the period of six months.

Material and methods. Using general histological and immunohistochemical methods to study the rats' liver after a single parenteral administration of 1 ml of silicon dioxide nanoparticles at a dose of 7 mg/kg of body weight at a concentration of 2 mg/ml. The sections of the rats' liver were studied by general histological and immunohistochemical methods after injection of 1 mL of a SDNPs saline suspension at a concentration of 2 mg/mL (7mg/kg of body weight). Control animals were injected with 1 ml of saline solution. The material was collected in 21 days, 2, 4 and 6 months months after the administration of the SDNPs and it was fixed in 10% neutral formaldehyde.

Results. The formation of granulomas in the liver on the 21st day of the experiment and an increase in the number of Kupfer cells were revealed. However, by the 2nd month of the experiment, the number of granulomas significantly decreases compared to the 21st day of the experiment and continues to decrease in subsequent periods. The average size of granulomas decreases during the 2nd month of the experiment and does not change during the subsequent periods of the experiment. After 6 months of the experiment, the morphofunctional state of the liver is characterized by slightly pronounced aseptic inflammation.

Conclusion. A single parenteral administration of silicon dioxide nanoparticles causes pronounced aseptic inflammation of the liver, decreasing by the 6th month of the experiment. Connective tissue remodeling in the liver is not observed at all periods of the experiment.

Key words: liver, macrophage granulomas, silicon dioxide nanoparticles.

***Автор для переписки:**

Юкина Галина Юрьевна

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, ул. Льва Толстого, 6-8, г. Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация

***Corresponding author:**

Galina Yukina

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, ul. L'va Tolstogo, 6-8, St-Petersburg, 197022, Russian Federation

E-mail: pipson@inbox.ru

Введение

Диоксид кремния широко применяется для решения медицинских задач и может считаться перспективным материалом для создания матриц, выступающих вектором таргетной доставки лекарственных препаратов в макроорганизм. Наночастицы диоксида кремния (НЧДК) являются биосовместимыми и биodeградируемыми и, благодаря свойствам разветвленной поверхности, способны проникать через гистогематические барьеры [2, 5]. Но, несмотря на имеющиеся многочисленные экспериментальные данные, существует дефицит фундаментальных исследований, посвященных органной специфике интернализации нанобъектов *in vivo*. Так как имеющиеся данные противоречивы, и проблема безопасности НЧДК остается злободневной, требуются дальнейшие тщательные исследования их цитотоксического эффекта. По литературным данным, отличительной особенностью НЧДК является образование реакционных форм кислорода и развитие апоптоза [11, 8, 6]. Так, показан цитотоксический эффект в культуре клеток эмбриона мыши, где НЧДК размером 10 и 30 нм нарушали дифференцировку кардиомиоцитов [10]. Также в литературе обсуждаются данные о высокой степени токсичности НЧДК размером 14–16 нм по отношению к эндотелиальным клеткам человека перевиваемой линии EA.Hy926 [9], и размером 21 нм по отношению к культуре клеток печени линии L-02 [12]. Проведенные исследования на крысах выявили признаки токсического действия НЧДК размером 6–30 нм при пероральном введении в дозах 0.1–100 мг/кг массы тела в течение 92 суток в тонкой кишке, проявляющиеся в первую очередь, в развитии воспалительной реакции [1]. Данные другого исследования, в котором крысам НЧДК размером 25 нм вводились ингаляционно в течение 3 месяцев, показали, что, несмотря на выраженную клеточную реакцию дыхательных путей, их общетоксический и фиброгенный эффект несущественен [3]. В то же время в работе Н. Lu с соавт. (2011) было показано чрезвычайно токсичное влияние парентерально вводимых НЧДК размерами 30 и 70 нм в дозах 10 и 40 мг/кг соответственно на печень и легкие мыши с формированием в них очагов некроза уже через 24 часа [7]. Тем не менее, вопрос о биологических эффектах НЧДК на длительных эксперимен-

тальных сроках *in vivo* исследован недостаточно. В связи с этим решение фундаментальной проблемы нанотоксикологии о влиянии НЧДК на разные органы и в различные сроки является актуальным и имеет огромный интерес.

Цель работы – изучение морфофункциональных изменений в печени крысы после однократного парентерального введения наночастиц диоксида кремния размером 12 нм в течение 6 мес.

Материал и методы исследования

Исследование проведено на 40 самцах крыс линии Wistar. Животных разделили на 2 группы: 1-ю, контрольную (К), (n=20), с введением 1 мл физиологического раствора; 2-ю, экспериментальную (Э), (n=20), с однократным введением в хвостовую вену 1 мл суспензии НЧДК («Аэросил 200») размером 12 нм в физиологическом растворе в дозе 7 мг/кг массы тела в концентрации 2 мг/мл. Для проведения экспериментов *in vivo* использовался препарат высокой степени чистоты «Аэросил 200» («Aerosil 200 Pharma», Evonik Operations GmbH, Германия). Манипуляции с животными проводили в условиях анестезии раствором золетила (6 мг/кг), вводимого внутривенно. При исследованиях руководствовались Приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с рекомендациями этического комитета ФГБОУ ВО «СПбГМУ им. И.П. Павлова» Минздрава России.

Взятие материала осуществляли на 21-е сутки, через 2, 4 и 6 месяцев после введения НЧДК от 5 животных в группе (группы 21Э, 2Э, 4Э и 6Э, соответственно). Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере (pH 7.4). Срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Accu-Cut SRT 200 (Sakura, Япония) и окрашивали гематоксилином и эозином (Биовитрум, Россия) и по методу Маллори (Биовитрум, Россия). Макрофаги выявляли при помощи первичных моноклональных (клон ED1) мышинных антител к белку CD68 фирмы Abscam (Великобритания). Препараты докрашивали гематоксилином Майера (Биовитрум, Россия).

Проводили подсчет клеток Купфера (КК), гранулем в печени (ГП) и определение их размера на цифровых изображениях срезов, 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 10 полях зрения, площадью по 0.33×0.25 мм, с объективом ×10, окуляром ×40. Абсолютное

Таблица 1

Динамика показателей объектов морфометрии в печени после введения наночастиц диоксида кремния

Объекты морфометрии	Группы							
	К (физ. р-р)	21 Э НЧДК	К (физ. р-р)	2 Э НЧДК	К (физ. р-р)	4 Э НЧДК	К (физ. р-р)	6 Э НЧДК
Число гранул	—	22±2	—	6±2*	—	4±1*	—	2±1*
Средний размер гранул (мм ²)	—	0.024±0.004	—	0.013±0.003	—	0.014±0.003	—	0.013±0.003
Число клеток Купфера	13±1	11±1	12±1	18±1*	13±1	15±1	14±1	17±2

Примечание: * – показатели статистически значимо отличаются от экспериментальной группы на 21-е сут эксперимента при $p < 0.05$; # – показатели статистически значимо отличаются от группы контроля при $p < 0.05$.

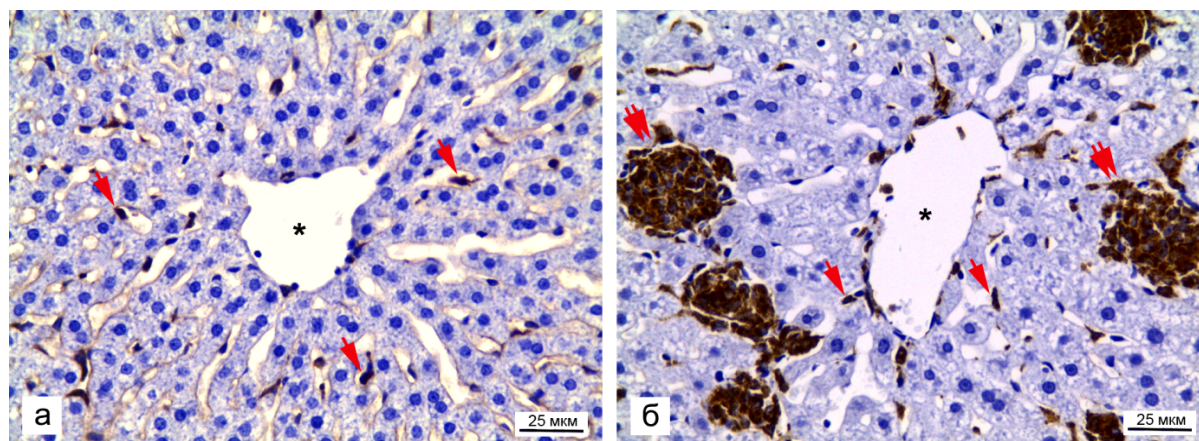


Рис. 1. Участок печеночной дольки контрольного животного (а) и на 21-е сутки эксперимента (б). Одиночные стрелки – клетки Купфера, двойные стрелки – гранулемы. Иммуногистохимическое выявление CD68+ клеток с докраской срезов гематоксилином. Ув. ×400.

число гранул в печени подсчитывали в 10 последовательных полях зрения общей площадью 15.8 мм² на одном срезе у каждого животного с объективом ×10, окуляром ×10. Площадь вычисляли у 10 случайно выбранных гранул на одном срезе у каждого животного с использованием функции ручного измерения объектов, путем выделения гранулемы в окружность с последующим автоматическим подсчетом площади с объективом ×10, окуляром ×40. Визуально оценивали содержание соединительной ткани в паренхиме печени. Статистическую обработку проводили с использованием стандартного пакета Statistica 7.0 Stat. Soft for Windows по группам с объемом выборки 50 элементов (5 животных в группе, 10 полей зрения с 1 микропрепарата). Нормальность распределения данных в каждой группе подтверждена с вероятностью ошибки < 0.05 по W-критерию Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различий между группами экспериментальных животных при нормальном распределении количественных данных использовали t-критерий Стьюдента. Значимыми считали различия между средними показателями при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Показано, что в группе 21Э печеночные пластинки приобретают нехарактерный ход

вследствие сформированных ГП, число которых составляло 22±2, их средний размер находился в пределах 0.024±0.004 мм². Количество КК в поле зрения было равно 11±1, что было незначимо ниже, чем в группе К (табл. 1).

ГП состояли из компактно лежащих CD68+ клеток, между которыми встречались единичные эозинофилы и лимфоциты, коллагеновых волокон между ними не выявлялось (рис. 1).

В группе 2Э число ГП значимо уменьшалось до 6±2, продолжало снижаться, составляя в группе 6Э 2±1. Размер ГП в группе 2Э уменьшался до 0.013±0.003 мм² и оставался таковым в группах 4Э и 6Э. В группе 2Э число КК значимо возрастало до 18±1, и оставалось на повышенном уровне в группах 4Э и 6Э (табл. 1). На всех сроках эксперимента в гепатоцитах, лежащих рядом с ГП, наблюдались признаки неярко выраженной зернистой дистрофии. Коллагеновых волокон в ГП и между гепатоцитами не выявлено.

Ранее нами показано формирование ГП и соединительнотканное ремоделирование стромы печени при парентеральном введении НЧДК на ранних экспериментальных сроках [4]. В настоящем исследовании парентеральное введение НЧДК приводило к формированию гранул в печени, но соединительнот-

канного ремоделирования стромы печени мы не наблюдали. К 6 мес эксперимента происходило структурно-функциональное восстановление органа, определялись лишь единичные гранулемы и незначительно повышенное число КК.

Заключение

Однократное внутривенное введение НЧДК вызывает хроническое асептическое воспаление в виде диффузного гранулематоза без признаков соединительнотканного ремоделирования в печени. Полученные данные свидетельствуют о необходимости модификации НЧДК исследуемого размера с целью снижения их биотоксичности.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Зайцева Н.В., Землянова М.А., Звездин В.Н., Довбыш 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):80–94 [Zaitseva NV, Zemlyanova MA, Zvezdin VN, Dovbysh AA, Gmoshinskiy IV, Khotimchenko SA. Impact of silica dioxide nanoparticles on the morphology of internal organs in rats by oral supplementation. Health Risk Analysis. 2016 Apr;(4):80–94] (in Russian). doi: 10.21668/health.risk/2016.4.10
2. 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;132(1):3–15 [Podkolodnaya OA, Ignatieva EV, Podkolodnyi NL, Kolchanov NA. Pathways for penetration of nanoparticles into mammalian organisms, their biocompatibility and cellular effects. Uspekhi Sovremennoi Biologii. 2012;132(1):3–15] (in Russian).
3. Сутункова М.П., Соловьева С.Н., Кацнельсон Б.А., Гурвич В.Б., Привалова Л.И., Минигалиева И.А., и др. Некоторые особенности реакции организма на хроническую ингаляцию SiO₂-содержащих субмикронных (преимущественно наноразмерных) частиц реального промышленного аэрозоля. Токсикологический вестник. 2017;(3):17–26 [Sutunkova MP, Solovyeva SN, Katsnelson BA, Gurvich VB, Privalova LI, Minigalieva IA, et al. Some peculiarities of the organism's responses to a long-term inhalation of silica-containing submicron (predominantly, nanoscale) particles in a real industrial aerosol. Toxicological Review. 2017 Jun 28;(3):17–26] (in Russian). doi: 10.36946/0869-7922-2017-3-17-26
4. Юкина Г.Ю., Журавский С.Г., Паневин А.А., Галагудза М.М., Томсон В.В., Блюм Н.М. Взаимодействие тканевых макрофагов и тучных клеток как начало органного ремоделирования в рамках хронической токсичности наночастиц кремнезема. Трансляционная медицина. 2016;3(2):70–9 [Yukina GYu, Zhuravskii SG, Panevin AA, Galagudza MM, Tomson VV, Blum NM. Macrophage granulomas and mast cells as beginning organ remodeling in case of silicon dioxide nanoparticles chronic toxicity. Translational medicine. 2016;3(2):70–9] (in Russian).
5. Ebbesen M, Jensen TG. Nanomedicine: Techniques, Potentials, and Ethical Implications. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2006;1:1–11. doi: 10.1155/jbb/2006/51516
6. Eom H-J, Choi J. Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B. Toxicology in Vitro. 2009 Oct;23(7):1326–32. doi: 10.1016/j.tiv.2009.07.010
7. Lu X, Tian Y, Zhao Q, Jin T, Xiao S, Fan X. Integrated metabolomics analysis of the size-response relationship of silica nanoparticles-induced toxicity in mice. Nanotechnology. 2010 Dec 23;22(5):055101. doi: 10.1088/0957-4484/22/5/055101
8. Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Tochigi S, Kondoh S, et al. Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes. Particle and Fibre Toxicology. 2011 Jan 15;8(1):1–10. doi: 10.1186/1743-8977-8-1
9. Napierska D, Thomassen LCJ, Rabolli V, Lison D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, et al. Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells. Small. 2009 Apr 6;5(7):846–53. doi: 10.1002/smll.200800461
10. Park MVDZ, Annema W, Salvati A, Lesniak A, Elsaesser A, Barnes C, et al. In vitro developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles. Toxicology and Applied Pharmacology. 2009 Oct;240(1):108–16. doi: 10.1016/j.taap.2009.07.019
11. Thomassen LCJ, Aerts A, Rabolli V, Lison D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, et al. Synthesis and Characterization of Stable Monodisperse Silica Nanoparticle Sols for in Vitro Cytotoxicity Testing. Langmuir. 2009 Aug 21;26(1):328–35. doi: 10.1021/la902050k
12. Ye Y, Liu J, Xu J, Sun L, Chen M, Lan M. Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line. Toxicology in Vitro. 2010 Apr;24(3):751–8. doi: 10.1016/j.tiv.2010.01.001

Поступила в редакцию 17.09.2021

Принята в печать 3.11.2021

Received 17.09.2021

Accepted 3.11.2021

Для цитирования: Юкина Г.Ю., Сухорукова Е.Г., Половников И.В., Крыжановская Е.А. Влияние наночастиц диоксида кремния на морфологию печени крысы при парентеральном введении. Журнал анатомии и гистопатологии. 2021; 10(4): 85–88. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-4-85-88

For citation: Yukina G.Yu., Sukhorukova E.G., Polovnikov I.V., Kryzhanovskaya E.A. Effect of Silicon Dioxide Nanoparticles on Liver Morphology of Rats in Parenteral Administration. Journal of Anatomy and Histopathology. 2021; 10(4): 85–88. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-4-85-88