

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Краткое сообщение

УДК [612.017:661.718.5]:612.118.24
doi:10.18499/2225-7357-2022-11-3-114-117
1.5.22 – клеточная биология
3.3.2 – патологическая анатомия



Макрофаги респираторного отдела легких крыс после однократного парентерального введения наночастиц диоксида кремния различного размера

Г. Ю. Юкина[✉], Е. Г. Сухорукова, И. В. Половников,
Е. А. Крыжановская, С. Г. Журавский

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

Аннотация. Цель исследования – анализ макрофагального пула респираторного отдела легкого крысы в течение 6 мес. после однократного парентерального введения наночастиц диоксида кремния размером 7 и 34 нм.

Материал и методы. С помощью гистологических и иммуногистохимических методов исследован респираторный отдел легких крыс после однократного парентерального введения 1 мл наночастиц диоксида кремния размером 7 нм и 34 нм в дозе 7 мг/кг массы тела в концентрации 2 мг/мл. Контрольным животным вводили 1 мл физиологического раствора. Для изучения хронической токсичности материал забирали через 21 сутки, 2, 4 и 6 мес. после введения и фиксировали в 10% нейтральном формалине.

Результаты. Показано увеличение числа интерстициальных и альвеолярных макрофагов через 4 мес. после введения наночастиц диоксида кремния размером 7 нм, с нормализацией показателей к 6 мес. Применение наночастиц размером 34 нм не вызывает значимых изменений в респираторном отделе легкого на всех сроках эксперимента.

Заключение. Однократное парентеральное введение наночастиц диоксида кремния приводит к развитию асептического воспаления в интерстиции респираторного отдела легких и увеличению числа альвеолярных макрофагов на 4 мес. эксперимента только при введении наночастиц кремнезема размером 7 нм. Оба размера наночастиц не вызывают соединительнотканного ремоделирования легкого на всех сроках эксперимента.

Ключевые слова: респираторный отдел легких крыс, макрофаги, наночастицы диоксида кремния, хроническая *in vivo* токсичность

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: 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. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-3-114-117>

BRIEF ARTICLES

Brief article

Macrophages of the respiratory division of the lungs of rats after a single parenteral injection of silicon dioxide nanoparticles of various sizes

G. Yu. Yukina[✉], E. G. Sukhorukova, I. V. Polovnikov, E. A. Kryzhanovskaya, S. G. Zhuravskii
I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Abstract. The aim of the study was macrophages analysis of the respiratory tract in rats after a single parenteral administration of the silicon dioxide nanoparticles in a size of 7 nm and 34 nm during 6 months.

Material and methods. The sections of the rat lung were studied using the methods of histology and immunohistochemistry after injection of 1 ml of 7 and 34 nm a SDNPs saline suspension at a concentration of 2 mg/ml (7mg/kg). Control animals were administered 1ml saline solution. To study chronic toxicity material sampling was performed on the 21st day, and 2, 4 and 6 months after the administration of the SDNPs (5 animals in the group) and fixed in 10% neutral formalin.

Results. An increase in the number of interstitial and alveolar macrophages were identified by 4 months of the experiment after the introduction of silicon dioxide nanoparticles with a size of 7 nm, with normalization of the indicators by 6 months. The use of 34 nm nanoparticles does not cause significant changes of the respiratory tract of rats at all times of the experiment.

Conclusion. A single parenteral administration of silica nanoparticles causes aseptic inflammation of the respiratory tract of rats and an increase in the number of alveolar macrophages by 4 months of the experiment only with the introduction of 7 nm silica nanoparticles. Both nanoparticle sizes don't cause tissue remodeling of the lung throughout the experiment.

©Юкина Г.Ю., Сухорукова Е.Г., Половников И.В., Крыжановская Е.А., Журавский С.Г., 2022

Key words: respiratory tract of rats, macrophages, silicon dioxide nanoparticles, chronic in vivo toxicity

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

For citation: Yukina G.Yu., Sukhorukova E.G., Polovnikov I.V., Kryzhanovskaya E.A., Zhuravskii S.G. Macrophages of the respiratory division of the lungs of rats after a single parenteral injection of silicon dioxide nanoparticles of various sizes. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2022. V. 11, №3. P. 114–117. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2022-11-3-114-117>

Введение

Наночастицы диоксида кремния (НЧДК) из-за своих уникальных свойств, пригодных для применения *in vivo*, являются многообещающими биоинженерными платформами для создания систем доставки лекарств, белков, пептидов, генов, диагностики рака и биовизуализации. В связи с этим НЧДК широко используются в качестве имплантируемого носителя с контролируемым высвобождением лекарств, либо вводятся внутривенно [10]. Имеются сведения, что при внутривенном введении НЧДК накапливаются в основном в печени, селезенке и в легких [12]. Тяжесть легочной токсичности и механизмы, посредством которых НЧДК определяют реакцию клеток, показана для разных размеров наночастиц, в том числе с модифицированной поверхностью [4, 6, 7, 8, 9]. Feng L. показал, что при интратрахеальном введении НЧДК размером 60 нм преодолевают азрогематический барьер и спустя 48 часов вызывают дисфункцию эндотелия [3]. Установлено, что при пероральном введении НЧДК, в зависимости от дозы, нарушается кровообращение, в том числе в паренхиме легких, приводящее к кровоизлияниям [1]. В то же время показано, что при внутривенном введении НЧДК обладают острой токсичностью [5]. Исследования *in vivo* на мышцах выявило полиорганные повреждения и эндотелиальную дисфункцию уже через 4 и 24 часа после внутривенного введения НЧДК размером 20 нм и 100 нм соответственно [11]. Однако, данные о хронической токсичности НЧДК *in vivo*, в частности легочной, отсутствуют. При этом дальнейшее выяснение биологических эффектов НЧДК различных размеров на длительных сроках эксперимента поможет выявить не только возможные токсические эффекты, но и новые преимущества НЧДК.

Цель работы – изучение реакции интерстициальных и альвеолярных макрофагов респираторного отдела легких крыс при перитонеальном введении НЧДК размером 7 нм и 34 нм в течение 6 мес.

Материал и методы исследования

Исследование проведено на 60 самцах крыс стока Wistar соматически здоровых, массой 220–250 г. (ФГУП «ПЛЖ «Рапполово», Россия), содержащихся в стандартных условиях вивария конвенциональной категории. Животные были разделены на 3 группы: 1) контрольная (n=20) – с введением 1 мл фи-

зиологического раствора (К); 2) экспериментальная группа 1 (n=20) – с введением 1 мл суспензии НЧДК размером 7 нм (официальный препарат «Полисорб-МП», АО «Полисорб», Россия) в физиологическом растворе (ЭГ1); 3) экспериментальная группа 2 (n=20) – с введением 1 мл суспензии НЧДК размером 34 нм («Белая сажа БС 100», ООО «Товесорб», Россия) в физиологическом растворе (ЭГ2). В обоих экспериментальных случаях суспензию НЧДК в дозе 7 мг/кг массы тела в концентрации 2 мг/мл вводили однократно в хвостовую 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), вводимого внутривенно. При экспериментальных 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».

Материал забирали на 21-е сутки, через 2, 4 и 6 месяцев после введения НЧДК, по 5 животных в группе. Для гистологического анализа использовали парафиновые срезы легкого, растянутого при фиксации 10% формалином (pH 7,4). Срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Accu-Cut SRT 200 (Sakura, Япония), окрашивали гематоксилином и эозином, а также по методу Маллори (Бiovitrum, Россия). Макрофаги выявляли при помощи первичных моноклональных (клон ED1) мышинных антител к белку CD68 фирмы Abcam (Великобритания). Препараты докрашивали гематоксилином Майера (Бiovitrum, Россия). Проводили подсчет альвеолярных и интерстициальных макрофагов (аМФ, иМФ) на цифровых изображениях срезов респираторного отдела легких, полученных при помощи светового микроскопа Leica DM750 (Leica, Германия) и цифровой фотокамеры ICC50 (Leica, Германия) с использованием прикладной компьютерной программы анализа изображений ImageScope Color (версия M).

Для каждого животного на срезе подсчитывали число CD68+ клеток в интерстиции и в альвеолах в 20 полях зрения, площадью 0,33×0,25 мм каждое поле, при об. 10, ок. 40. Визуально оценивали содержание соединительной ткани в респираторном отделе легкого. Статистическую обработку проводили с

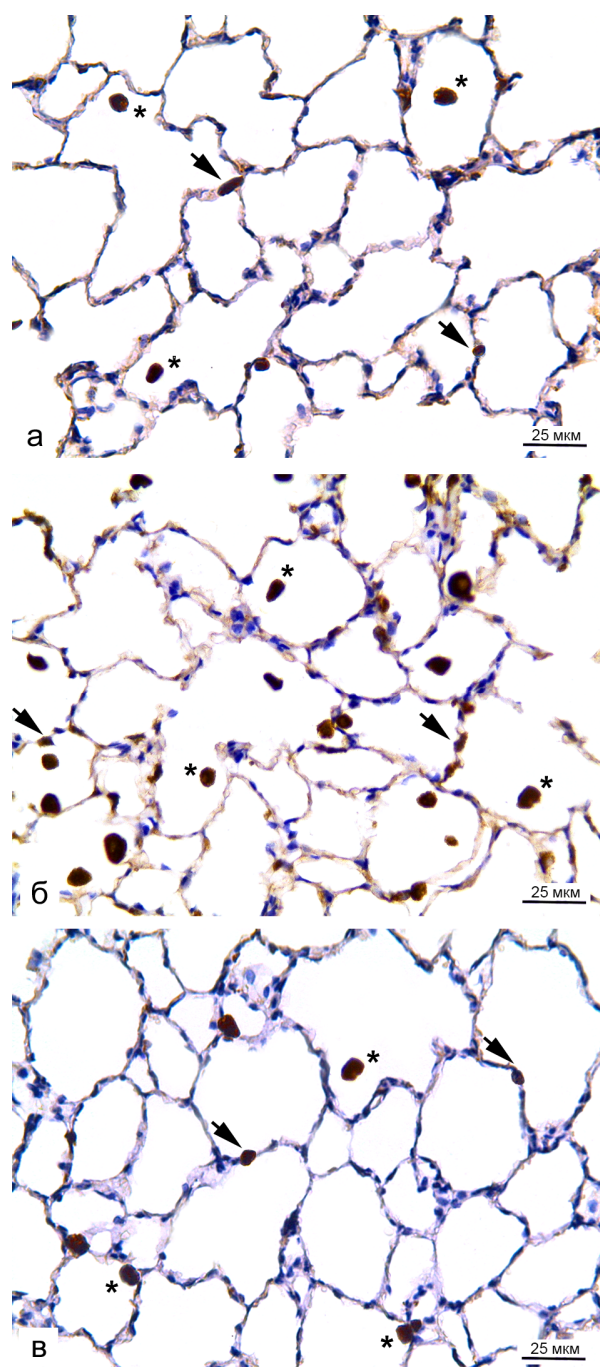


Рис. 1. Респираторный отдел легкого контрольного животного (а) и на 4-м мес. эксперимента после парентерального введения НЧДК размером 7 нм (б) и 34 нм (в). Звездочка – альвеолярный макрофаг, черная стрелка – интерстициальный макрофаг. Иммуногистохимическое выявление CD68⁺ клеток с подкраской срезов гематоксилином. Об.40, ок.10.

использованием стандартного пакета Statistica 7.0 Stat. Soft for Windows по группам с объемом выборки 100 элементов (5 животных в группе, 20 полей зрения 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 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

Микроскопически на всех экспериментальных сроках цитоархитектоника респираторного отдела сохранена и соответствует контрольной (рис. 1).

Через 21 сутки после введения НЧДК в обеих экспериментальных группах межальвеолярные перегородки визуально не утолщены, число интерстициальных и альвеолярных макрофагов (иМФ и аМФ, соответственно) значимо не увеличивалось. На 2-м мес. эксперимента в обеих группах число иМФ и аМФ находилось в пределах контрольных значений. Через 4 мес. эксперимента в ЭГ1 число иМФ и аМФ значимо возрастало по сравнению с группой К, в то время как в ЭГ2 данные показатели значимо не отличались от контрольных значений (рис. 1). На 6-м мес. эксперимента отмечалась нормализация численности иМФ и аМФ в обеих группах (табл. 1).

Результаты настоящего исследования выявили значимое увеличение иМФ и аМФ при однократном парентеральном введении НЧДК размером 7 нм и отсутствие значимой реакции со стороны этих клеток при однократном парентеральном введении НЧДК размером 34 нм. Это свидетельствует о том, что только НЧДК размером 7 нм проникают через компоненты аэрогематического барьера, вызывая реакцию иМФ и аМФ, что согласуется с литературными данными о большей токсичности наночастиц меньшего размера [6, 7]. Также полученные данные показали, что максимальная реакция респираторного отдела легкого в виде асептического воспаления, вызванного введением НЧДК размером 7 нм, проявляется на 4 мес. эксперимента. Это, вероятно, обусловлено активной биodeградацией НЧДК размером 7 нм на данном сроке эксперимента, как и при введении НЧДК размером 12 нм [2]. При этом очевидно, что биodeградация НЧДК размером 34 нм практически не затрагивает респираторный отдел легкого.

Заключение

Однократное парентеральное введение наночастиц диоксида кремния приводит к развитию асептического воспаления в интерстиции респираторного отдела легких и увеличению числа альвеолярных макрофагов на 4-м мес. эксперимента только при введении наночастиц кремнезема размером 7 нм. Важно отметить, что в обеих экспериментальных группах на всех сроках эксперимента не наблюдается соединительнотканного ремоделирования паренхимы легкого.

Таблица 1

Динамика показателей объектов морфометрии в респираторном отделе легкого после введения наночастиц диоксида кремния размером 7 нм и 34 нм

Срок	Группа	иМФ	аМФ
21 сут	К	5,0±0,7	6,0±0,5
	ЭГ1 (7нм)	6,0±0,5	6,0±1,0
	ЭГ2 (34нм)	7,0±1,0	7,0±1,1
2 мес.	К	8,0±1,1	6,0±1,0
	ЭГ1 (7нм)	6,0±0,9	6,0±1,0
	ЭГ2 (34нм)	5,0±1,1	5,0±0,6
4 мес.	К	5,0±0,8	5,0±0,9
	ЭГ1 (7нм)	11,0±2,6*	12,0±3,9*
	ЭГ2 (34нм)	5,0±0,8	4,0±0,5
6 мес.	К	8,0±1,1	10,0±0,9
	ЭГ1 (7нм)	5,0±0,7*	4,0±0,9*
	ЭГ2 (34нм)	8,0±2,4	8,0±2,9

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Список источников / 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 N.V., Zemlyanova M.A., Zvezdin V.N., Dovbysh A.A., Gmoshinskiy I.V., Khotimchenko S.A. Impact of silica dioxide nanoparticles on the morphology of internal organs in rats by oral supplementation. Health Risk Analysis. 2016; 4: 74–87] (in Russian). EDN XHTTDD doi: 10.21668/health.risk/2016.4.10
2. 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; 170 (7): 112–117 [Yukina G. Yu., Polovnikov I.V., Sukhorukova E.G., Zhuravskii S.G., Galagudza M.M. Morphological analysis of the respiratory tract of rats after parenteral administration of silicon dioxide nanoparticles. Bulletin of experimental biology and medicine. 2020; 170 (7): 112–117] (in Russian).
3. Feng L, Yang X, Liang S, Xu Q, Miller MR, Duan J, et al. Silica nanoparticles trigger the vascular endothelial dysfunction and prethrombotic state via miR-451 directly regulating the IL6R signaling pathway. Particle and Fibre Toxicology. 2019 Apr 11;16(1). doi: 10.1186/s12989-019-0300-x
4. Großgarten M, Holzlechner M, Vennemann A, Balbekova A, Wieland K, Sperling M, et al. Phosphonate coating of SiO₂ nanoparticles abrogates inflammatory effects and local changes of the lipid composition in the rat lung: a complementary bioimaging study. Particle and Fibre Toxicology. 2018 Jul 16;15(1). doi: 10.1186/s12989-018-0267-z
5. Handa T, Hirai T, Izumi N, Eto S, Tsunoda S, Nagano K, et al. Identifying a size-specific hazard of silica nanoparticles after intravenous administration and its relationship to the other hazards that have negative correlations with the particle size in mice. Nanotechnology. 2017 Feb 27;28(13):135101. doi: 10.1088/1361-6528/aa5d7c
6. Inoue M, Sakamoto K, Suzuki A, Nakai S, Ando A, Shiraki Y, et al. Size and surface modification of silica nanoparticles affect the severity of lung toxicity by modulating endosomal ROS generation in macrophages. Particle and Fibre Toxicology. 2021 Jun 17;18(1). doi: 10.1186/s12989-021-00415-0
7. Kersting M, Olejnik M, Rosenkranz N, Loza K, Breisch M, Rostek A, et al. Subtoxic cell responses to silica particles with different size and shape. Scientific Reports. 2020 Dec;10(1). doi: 10.1038/s41598-020-78550-5
8. Rabolli V, Badissi AA, Devosse R, Uwambayinema F, Yakoub Y, Palma-Pallag M, et al. The alarmin IL-1α is a master cytokine in acute lung inflammation induced by silica micro- and nanoparticles. Particle and Fibre Toxicology. 2014 Dec;11(1). doi: 10.1186/s12989-014-0069-x
9. Sharma N, Jha S. Amorphous nanosilica induced toxicity, inflammation and innate immune responses: A critical review. Toxicology. 2020 Aug;441:152519. doi: 10.1016/j.tox.2020.152519
10. Tang L, Cheng J. Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application. Nano Today. 2013 Jun;8(3):290–312. doi: 10.1016/j.nantod.2013.04.007
11. Wang D-P, Wang Z-J, Zhao R, Lin C-X, Sun Q-Y, Yan C-P, et al. Silica nanomaterials induce organ injuries by Ca²⁺-ROS-initiated disruption of the endothelial barrier and triggering intravascular coagulation. Particle and Fibre Toxicology. 2020 Mar 23;17(1). doi: 10.1186/s12989-020-00340-8
12. Xie G, Sun J, Zhong G, Shi L, Zhang D. Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice. Archives of Toxicology. 2009 Nov 20;84(3):183–90. doi: 10.1007/s00204-009-0488-x

Информация об авторах

Юкина Галина Юрьевна – зав. научной лабораторией патоморфологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова. Ул. Льва Толстого, 6/8, Санкт-Петербург, 197022; pipson@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8888-4135>
 Сухорукова Елена Геннадиевна; len48@inbox.ru
 Половников Илья Вячеславович; polierats@mail.ru
 Крыжановская Елена Александровна; elena777.05@mail.ru
 Журавский Сергей Григорьевич; s.jour@mail.ru

Information about the authors

Galina Yu. Yukina – head of pathomorphological laboratory of I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University. Ul. L'va Tolstogo 6/8, St. Petersburg, 197022; pipson@inbox.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8888-4135>
 Elena G. Sukhorukova; len48@inbox.ru
 Il'ya V. Polovnikov; polierats@mail.ru
 Elena A. Kryzhanovskaya; elena777.05@mail.ru
 Sergei G. Zhuravskii; s.jour@mail.ru

Статья поступила в редакцию 6.04.2022; одобрена после рецензирования 3.09.2022; принята к публикации 21.09.2022.

The article was submitted 6.04.2022; approved after reviewing 3.09.2022; accepted for publication 21.09.2022.