

ВТОРАЯ ПРЕМИЯ

РЕАКЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК НА ВВЕДЕНИЕ ЖЕЛЕЗОУГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Власова А. А.^{1,2}, Храмова Ю. С.^{1,2}

¹ Уральский Федеральный Университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

² Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия
vlasova.9@mail.ru, hramtsova15@mail.ru

Аннотация. Работа посвящена изучению реакции тучных клеток печени, легких, сердца, тимуса, почек и кожи на введение железоуглеродных наночастиц в модификации FeC (со структурой "ядро-(Fe)-углеродная оболочка"). Исследование показало, что первой на введение наночастиц реагирует печень уже на 1 сутки после введения. На 7 сутки происходит активация тучных клеток легких и сердца. На 30 сутки активируются тучные клетки тимуса и кожи. Тучные клетки почек никак не реагируют на введение железоуглеродных наночастиц.

Ключевые слова: тучные клетки, железоуглеродные наночастицы, печень, легкие, сердце, тимус, кожа, почки

MAST CELLS REACTION TO INTRODUCTION OF IRON CARBON NANOPARTICLES

Vlasova A.^{1,2}, Khramtsova Yu.^{1,2}

¹ Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

² Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia
vlasova.9@mail.ru, hramtsova15@mail.ru

Abstract. In this study, we have identified the response of mast cells of the liver, lungs, heart, thymus, kidneys and skin to the introduction of iron-carbon nanoparticles in the modification of FeC (with the structure of "nucleus-(Fe)-carbon membrane"). The study showed that the liver reacts first to the introduction of nanoparticles on the 1st day of experiment. Mast cells activation in the lungs and heart occurs on the 7th day after introduction. Mast cells of the thymus and skin are activated on the 30th day of experiment. Mast cells of the kidney do not react to the introduction of iron-carbon nanoparticles.

Key words: mast cells, iron-carbon nanoparticles, liver, lungs, heart, thymus, skin, kidneys

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наночастицы (НЧ), широко используются при решении разнообразных задач фармакологии и медицины. Среди всего многообразия НЧ, существующих на данный момент, одни могут быть использованы в качестве наноконтейнеров для направленной доставки лекарств [1, 2], другие – для визуализации морфологических изменений в органах и тканях [3], третьи – в качестве терапевтических средств [4]. Однако введение в организм НЧ в норме всегда сопровождается ответом иммунной системы, важным компонентом которой являются тучные клетки (ТК). ТК первыми реагируют на появление чужеродных объектов в организме и выступают в качестве ключевых эффекторов при аллергических и воспалительных процессах [11, 12, 13], именно поэтому их реакция является отличным показателем биосовместимости наноматериала, что свидетельствует о важности и актуальности изучения данной темы.

Цель данной работы – изучить реакцию тучных клеток различных органов на введение железоуглеродных наночастиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на крысах Вистар (n=33). Все манипуляции с животными проводились с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах или в иных научных целях. Железоуглеродные НЧ в модификации FeC (со структурой "ядро-(Fe)-углеродная оболочка") стабилизировали в водной среде с использованием DSPE-PEG-2000 (дистеароилфосфатидилэтаноламин-полиэтиленгликоль-2000), который представлял собой поверхностно-активное вещество и образовывал мицеллярные системы, инертные по отношению к биологическим средам. НЧ были синтезированы в ИФМ УрО РАН (г. Екатеринбург). Суспензию НЧ FeC-DSPE-PEG-2000 готовили путем ультразвуковой обработки смеси, содержащей металл-углеродные частицы (2,5 г/л) и вспомогательное вещество (75 г/л) в физиологическом растворе. НЧ лабораторным животным вводили внутривенно в хвостовую вену в количестве 0,7 мл однократно, их концентрация в растворе составляла 5 мг/мл. Выведение животных из эксперимента производили передозировкой диэтилового эфира на 1, 7 и 30 сутки после введения НЧ.

Для гистологического исследования производили забор органов (тимус, селезенка, печень, сердце, кожа, почки, легкие), которые фиксировали в 10%

растворе формалина. После стандартной проводки готовили срезы толщиной 4 мкм, затем окрашивали их толуидиновым синим по стандартной методике. Проводили гистологическое описание препаратов всех исследуемых органов, оценивали синтетическую и функциональную активность ТК. Синтетическую активность оценивали с помощью среднего гистохимического коэффициента, который рассчитывали по формуле J. Astaldi, L. Verga [61]. Для оценки функциональной активности использовали индекс дегрануляции (1):

$$\text{ИД} = \frac{Д}{Д+Н} * 100\% \quad , \quad (1)$$

где Д – количество тучных клеток с явными признаками дегрануляции (0 тип по J. Astaldi, L. Verga), Н – количество не активированных тучных клеток (1,2,3 типы по J. Astaldi, L. Verga).

Морфометрические исследования проводили с помощью светового микроскопа Leica DM 2500.

Концентрацию НЧ в тканях определяли с помощью магнитных измерений на весах Фарадея, обеспечивающих чувствительность по концентрации частиц до 0,002 мг/г.

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрических методов. Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Данные представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В ходе предыдущих исследований было показано, что НЧ в организме распределяются не равномерно, их активное накопление происходит в 6-ти исследуемых органах: тимус, селезенка, печень, сердце, почки, легкие [64, 68]. Кожа в данном исследовании была взята в качестве контроля, как орган богатый ТК, но фиксация железоуглеродных НЧ в данном органе не происходит. Селезенка выступает в качестве органа, внутри которого ТК не встречаются: они располагаются в соединительно-тканной капсуле вокруг органа. В связи с чем оценить ТК селезенки в настоящей работе не представляется возможным.

Реакция ТК на введение железоуглеродных НЧ происходит разнонаправленно в различных органах. На ранних сроках после введения НЧ первыми реагируют ТК печени – органа, где в большей степени происходила фиксация наноматериала (рис.1).

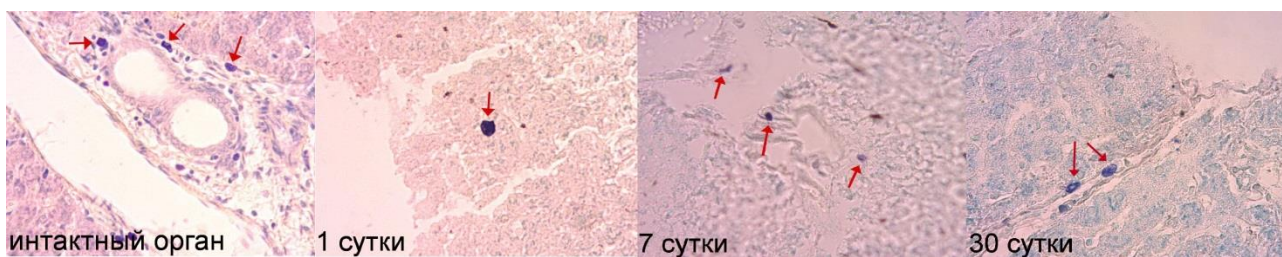


Рисунок 1 – Тучные клетки печени до и после введения железоуглеродных наночастиц. Увеличение $\times 40$. Стрелками показаны тучные клетки

Число ТК печени уменьшается на 1 сутки ($3,10 \pm 0,26$ шт в мм^2 органа по сравнению с интактными $10,60 \pm 2,11$ шт в мм^2 органа) и немного возрастает на 7-е ($4,50 \pm 0,34$ шт в мм^2 органа), что может быть связано с миграцией ТК между печенью и прилежащими тканями. После чего к концу эксперимента число ТК становится меньше интактного значения (0 шт в мм^2 органа). При этом функциональная активность ТК усиливается к 7 суткам ($25,50 \pm 4,30\%$ по сравнению с интактными 0%) и возвращается к интактным значениям вместе с падением синтетической активности (0 усл.ед. по сравнению с интактными $2,39 \pm 0,07$ усл.ед.), что может быть связано с одновременной работой макрофагов в этом органе.

На 7 сутки происходит активация мастоцитов легких (рис.2), где так же содержится большое количество НЧ, и сердца (рис.3).

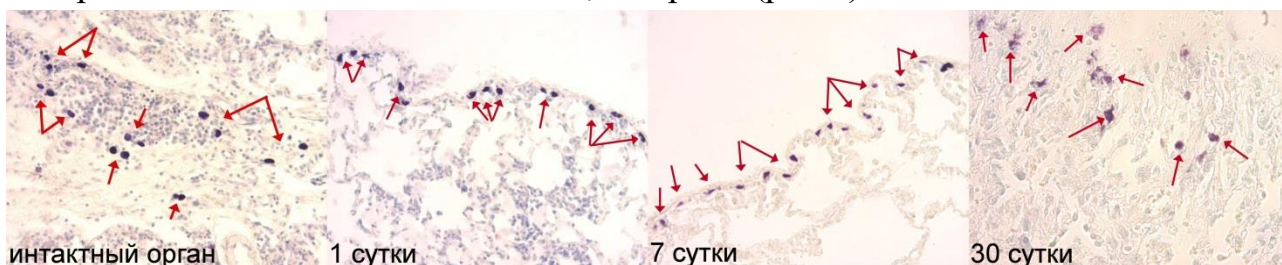


Рисунок 2 – Тучные клетки легких до и после введения железоуглеродных наночастиц. Увеличение $\times 20$. Стрелками показаны тучные клетки

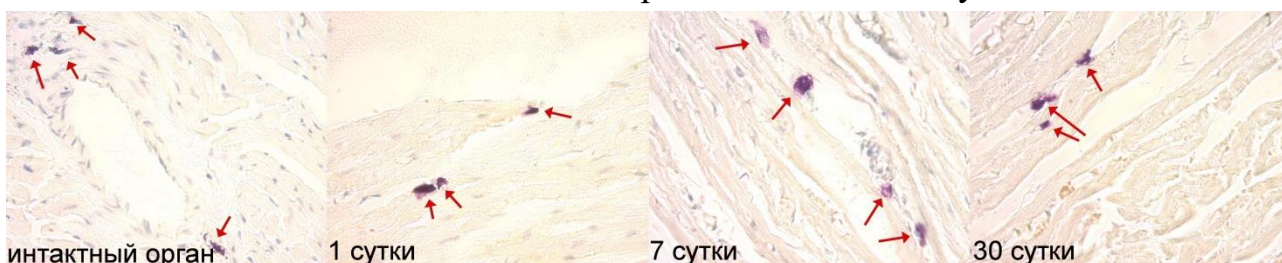


Рисунок 3 – Тучные клетки сердца до и после введения железоуглеродных наночастиц. Увеличение $\times 40$. Стрелками показаны тучные клетки

В легких на 7 сутки после введения железоуглеродных НЧ начинается активный выброс факторов ТК ($4,11 \pm 1,98\%$ по сравнению с интактными 0%) при одновременном снижении их синтетической активности ($2,08 \pm 0,11$ усл.ед. по

сравнению с 1 сутками $2,52 \pm 0,08$ усл.ед.). Возможной причиной этому может являться истощение функции макрофагов, при котором идет активизация ТК, после чего к 30 суткам их функция угасает. Тучные клетки сердца реагируют на введение НЧ достоверным увеличением синтетической активности ($2,48 \pm 0,09$ усл.ед. по сравнению с интактными $1,65 \pm 0,27$ усл.ед.) и уменьшением функциональной ($5,37 \pm 2,29\%$ по сравнению с интактными $24,68 \pm 11,00\%$) на 7 и 30 сутки после введения.

На поздних сроках к вышеперечисленным тучноклеточным популяциям подключаются ТК тимуса (рис.4) и кожи (рис.5).

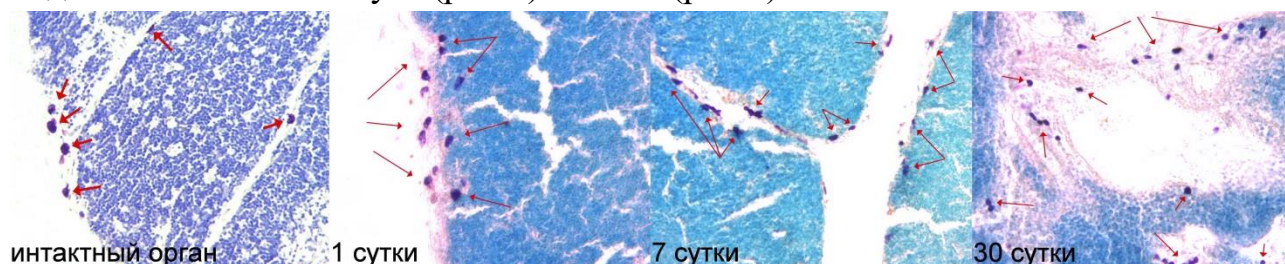


Рисунок 4 – Тучные клетки тимуса до и после введения железоуглеродных наночастиц. Увеличение $\times 20$. Стрелками показаны тучные клетки

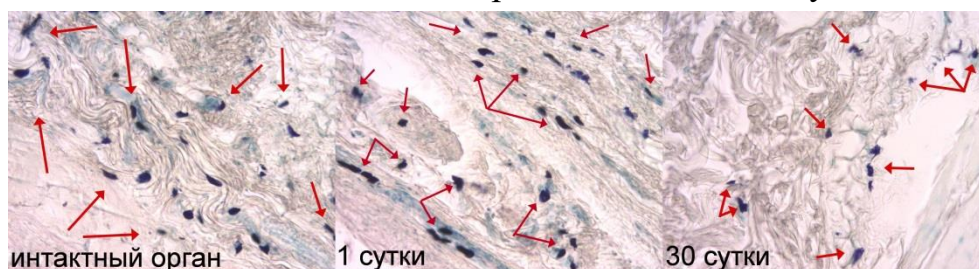


Рисунок 5 – Тучные клетки кожи до и после введения железоуглеродных наночастиц. Увеличение $\times 20$. Стрелками показаны тучные клетки

В тимусе происходит достоверное увеличение количества ТК к 30 суткам ($75,44 \pm 7,83$ шт в мм^2 органа по сравнению с интактными $31,20 \pm 3,37$ шт в мм^2 органа). Синтетическая и функциональная активности ТК тимуса не меняются на протяжении всего эксперимента. В коже, как в контрольном органе, достоверные изменения происходят только на 30-е сутки после введения железоуглеродных НЧ. Можно заметить, что к концу эксперимента происходит уменьшение числа ТК ($38,20 \pm 4,78$ шт в мм^2 органа по сравнению с интактными $83,60 \pm 10,11$ шт в мм^2 органа) при одновременном снижении синтетической активности ($2,04 \pm 0,08$ усл.ед. по сравнению с 1 сутками $2,43 \pm 0,11$ усл.ед.) и усилении функциональной ($30,68 \pm 2,87\%$ по сравнению с интактными $19,9 \pm 3,54\%$).

ТК почек никак не реагируют на введение железоуглеродных НЧ на протяжении всего эксперимента.

ВЫВОДЫ

Реакция тучных клеток на введение железоуглеродных наночастиц происходит разнонаправлено в различных органах. На ранних сроках после введения наночастиц первыми реагируют тучные клетки печени – органа, где в большей степени происходила фиксация наноматериала. На 7 сутки происходит активация тучных клеток легких и сердца. На поздних сроках к вышеперечисленным тучноклеточным популяциям подключаются тучные клетки тимуса и кожи. Тучные клетки почек никак не реагируют на введение железоуглеродных наночастиц.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Храмцова, Ю. С., Арташян, О. С., Юшков, Б. Г., Волкова, Ю. Л., Незговорова Н. Ю. Влияние тучных клеток на репаративную регенерацию тканей с разной степенью иммунологической привилегированности // Цитология. – 2016. – V. 58, № 5. – P. 356–363.
2. Храмцова Ю. С., Тюменцева Н. В., Юшков Б. Г., Силантьева Е. А., Медведева С. Ю., Бызов И. В., Уймин М. А., Ермаков А. Е. Реакция лимфоидных органов на введение железоуглеродных наночастиц // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – № 8. – С. 218–221.
3. Astaldi G., Verga L. The glycogen content of the cells of lymphatic leukemia // Acta haematol. – 1957. – V. 17, № 3. – P. 129–136.
4. Мухлынина Е. А. Анализ функциональной активности тучных клеток кожи крыс при хроническом воспалении // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2014. – №3. – С. 35–36.
5. Надин К. А. Тучные клетки как фактор развития воспалительных процессов в соединительной ткани // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2012. – Т. 10, № 1. – С. 22–27.
6. Уханова О. П. Современные представления о программированной гибели тучных клеток и базофилов при аллергическом воспалении // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т. 10, № 4. – С. 463–468.
7. Luk B. T., Zhang L. Cell membrane-camouflaged nanoparticles for drug delivery // Journal of controlled release. – 2015. – V. 220, № 2. – P. 600–607.
8. Maeda H., Bharate G. Y., Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2009. – V. 71, № 3. – P. 409–419.
9. Fenske D. B., Chonn A., Cullis P. R. Liposomal nanomedicines: an emerging field // Toxicologic pathology. – 2008. – V. 36, № 1. – P. 21–29.

10. Park J. H., Lee S., Kim J. H., Kwon I. C. Polymeric nanomedicine for cancer therapy // Progress in polymer science. – 2008. – V. 33, № 1. – P. 113–137.