

МОРФОГЕНЕЗ ГРАНУЛЕМАТОЗНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ПРИ ОДНОКРАТНОМ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ НАНОЧАСТИЦ АЛЮМИНИЯ

Великородная Ю.И., Фролова И.Г., Жуков В.Е., Дворяшина И.А

*Федеральное государственное унитарное предприятие
«Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии»
Федерального медико-биологического агентства,
400048, г. Волгоград, ул. Землячки, 12,
Тел. (8442) 78-62-57, e-mail: niigtp@rihtop.ru*

Резюме: Цель работы – изучение начальных изменений в гистоархитектонике легочной ткани после однократного интратрахеального введения наночастиц алюминия (НЧА). НЧА применяли в виде взвеси, приготовленной *ex tempore* в 2 % спиртовом растворе на деионизированной воде (в соотношении 1:24) в объеме 1,0 мл. Лабораторным животным индивидуальные навески 50 мг НЧА вводили интратрахеально. Животных выводили из эксперимента через 1, 3, 7, 14 и 28 суток для изучения первичной реакции легочной ткани в ответ на попадание НЧА, а также для оценки фиброзных процессов.

Результаты исследования микроскопического строения легочной ткани после однократного интратрахеального введения наноразмерной формы алюминия показало, что у лабораторных животных развивался к интерстициально-гранулематозный пневмокониоз, который по характеру течения можно отнести к быстропрогрессирующему, т.к. формирование эпителиоидно-клеточных гранулем отмечали уже на 7 сутки после попадания НЧА нижние отделы дыхательных путей, а через 28 суток выявляли признаки фиброзного перерождения легочной ткани.

Ключевые слова: пневмокониоз, алюминоз, гранулемы, наночастицы алюминия, внеклеточный матрикс, фиброз легких

**MORPHOGENESIS OF GRANULOMAS WITH A SINGLE INTRATRACHEAL
ADMINISTRATION OF ALUMINUM NANOPARTICLES**

Velikorodnaya Yu.I., Frolova I.G., Zhukov V.Ye., Dvoryashina I.A.

*Federal State Unitary Enterprise
"Research Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational Pathology"
at Federal Medical and Biology Agency
400048, Volgograd, Zemlyachka str., 12
e-mail: niiqtp@rihtop.ru*

Abstract: The aim of this work is to study the initial changes in the histoarchitectonics of the lung tissue after a single intratracheal injection of aluminum nanoparticles (NPA). NPA was used as a suspension prepared ex tempore in a 2% alcohol solution in deionized water (in a ratio of 1:24) in a volume of 1.0 ml. Individual weighed portions of 50 mg NPA were injected into laboratory animals intratracheally. The animals were taken out of the experiment after 1, 3, 7, 14 and 28 days to study the primary reaction of the lung tissue in response to NPA exposure, as well as to assess fibrotic processes. The results of the study of the microscopic structure of the lung tissue showed that laboratory animals developed to interstitial-granulomatous pneumoconiosis, which by the nature of the course can be attributed to the rapidly progressive, because the formation of epithelioid granulomas was noted on the 7th day after the introduction of NPA into the lower respiratory tract, but after for 28 days, signs of fibrous degeneration of the lung tissue were detected.

Key words: pneumoconiosis, aluminosis, granulomas, aluminum nanoparticles, extracellular matrix, pulmonary fibrosis

Введение

Пневмокониозы – это диффузные интерстициальные заболевания легких, вызываемые твердыми пылевыми частицами, чаще всего они связаны с профессиональным воздействием вредного фактора. Одна из разновидностей пневмокониоза – алюминоз – индуцируется аэрозолями алюминия при его использовании или получении. Взаимосвязь между вдыханием алюминиевой пыли и фиброзным перерождением легочной ткани у рабочих, занимающихся производством и обработкой алюминия, хорошо изучена, т.к. алюминий обладает выраженными фиброгенными свойствами со среднесменной ПДК¹_{с.с.} = 2,0 мг/м³.

В то же время, за последние 30 лет внимание гигиенистов, токсикологов и профпатологов привлечено к определению опасности воздействия наноразмерных частиц металлов, загрязняющих как воздух рабочей зоны, так и объекты окружающей природной среды [3, 4]. Изучение условий труда на предприятиях, производящих и применяющих соединения алюминия, показало, что в воздухе рабочей зоны наряду с грубодисперсными частицами вещества присутствуют и наноразмерные частицы [5]. При этом первичные реакции легочной ткани в ответ на попадание алюминиевой пыли, состоящей из наночастиц, в нижние отделы дыхательных путей изучены недостаточно.

Поэтому цель данной работы заключалась в изучении начальных изменений в гистоархитектонике легочной ткани после однократного интратрахеального введения наночастиц алюминия (НЧА).

Материалы и методы

Наночастицы алюминия. В качестве модельного соединения выступал алюминиевый порошок L-ALEXTM (100), который был получен путем распыления металлического проводника в атмосфере аргона и с целью пассивации поверхность частиц обработана пальмитиновой кислотой. Содержание активного алюминия составляло 90–92 % и пальмитиновой кислоты 8–10 %. Средний размер алюминиевых частиц, согласно спецификации производителя, находится в пределах 90–110 нм, отдельные частицы могут образовывать микроагломераты.

Определение среднего размера наночастиц алюминия перед экспериментом с помощью прибора Nanotrac (Microtrac, США) показало, что частицы алюминиевого порошка L-ALEXTM, суспензированные в водном растворе, содержащем ПАВ, имели средний размер 82,3 нм; в целом на фракции ≤ 85,9 нм приходилось 70,4 % (рисунок 1).

¹ ГН 2.2.5.3532-18. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны : утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 13.02.2018 г. № 25 (Зарегистрировано в Минюсте России 20.04.2018 г., № 50845) // Техэксперт : сайт. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/557235236> (дата обращения: 27.08.2021)

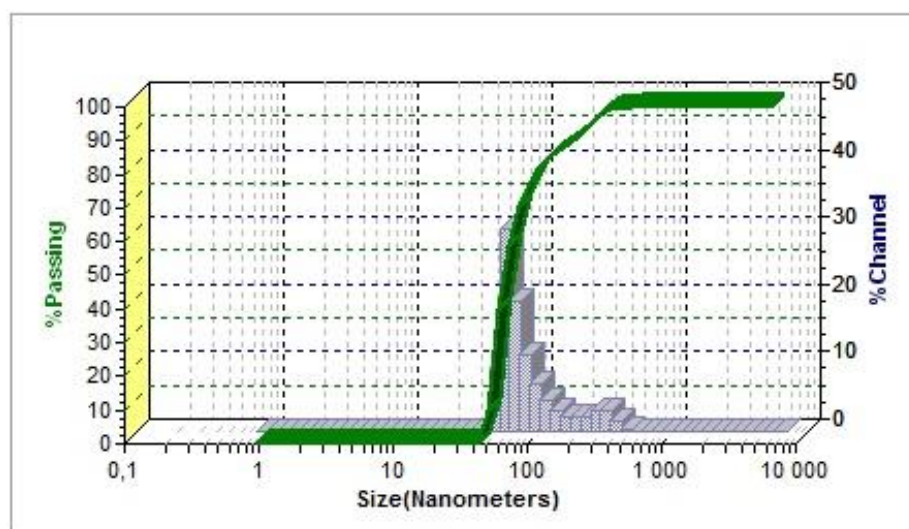


Рисунок 1 – Распределение частиц порошка L-ALEX™ в водном растворе, содержащем ПАВ

НЧА применяли в виде взвеси в 2 % спиртовом растворе на деионизированной воде (в соотношении 1:24) в объеме 1,0 мл. Взвесь готовили *ex tempore*, при этом необходимое количество вещества взвешивали индивидуально для каждого животного – 50 мг. Для минимизации агрегации наночастиц суспензию подвергали ультразвуковому диспергированию в течение 20 минут при 37 °С.

Лабораторные животные. Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г. При постановке экспериментов руководствовались требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных. Крыс содержали в клетках в помещениях с искусственным освещением (8.00-20.00ч. – свет, 20.00–8.00 ч. – темнота) при 20-22 °С в условиях свободного доступа к воде и пище.

Поступление НЧА лабораторным животным через верхние дыхательные пути моделировали интратрахеальным способом.

Животных выводили из эксперимента через 1, 3, 7, 14 и 28 суток для изучения первичной реакции легочной ткани в ответ на попадание НЧА, а также для оценки фиброзных процессов. Каждая опытная группа состояла из 6 особей.

Патоморфологическое исследование. Для морфологического исследования образцы тканей правого и левого легкого фиксировали в 4 % растворе параформальдегида (Sigma, ЕС), приготовленного на 0,01 М фосфатном буфере с pH 7,4 (Sigma, ЕС). Время пребывания в фиксаторе составляло 1–3 суток при 4 °С. Затем образцы обезвоживали в батарее спиртов восходящей крепости, просветляли в хлороформе с использованием гистопроцессора Cytadel 2000 (Shendon, Великобритания) и заключали в парафиновую среду Histomix (Биовитрум, Россия). Парафиновые блоки резали на ротационном

микротоме (MICROM HM340E, Германия), получали срезы толщиной 5 мкм и монтировали их на предметные стекла. Для обзорного исследования срезы окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятой методике, а для изучения распределения внеклеточного матрикса в легочной ткани применяли окраску парафиновых срезов по Masson [164].

Результаты исследования

При микроскопическом изучении легочной ткани животных через 1 сутки после однократного введения НЧА было обнаружено, что основная часть пылевых частиц выявлялась в просвете легочных бронхиол, а также в эпителиальных альвеолярных клетках (рисунок 2). Кроме того, попадание НЧА в нижние отделы дыхательных путей инициировало развитие воспалительного процесса, в результате чего в легочной ткани накапливались нейтрофилы, моноциты и макрофаги (рисунок 3).

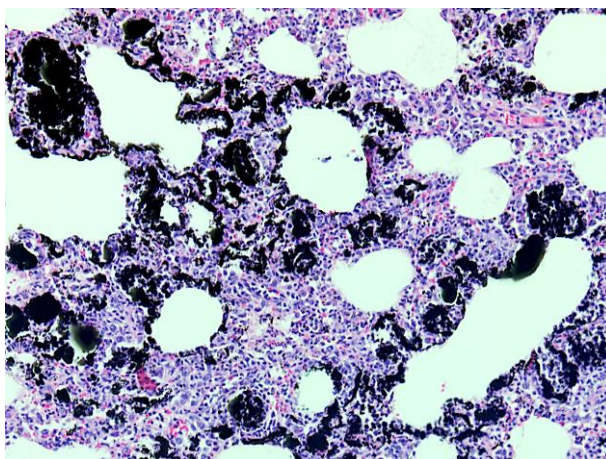


Рисунок 6 – Легкое крысы через 24 часа после однократного интратрахеального введения 50 мг наноразмерной фракции алюминия
Присутствие НЧА в просвете легочных бронхиол и в клетках эпителия альвеол.
Окраска гематоксилин-эозин-флоксином. Общее увеличение $\times 200$

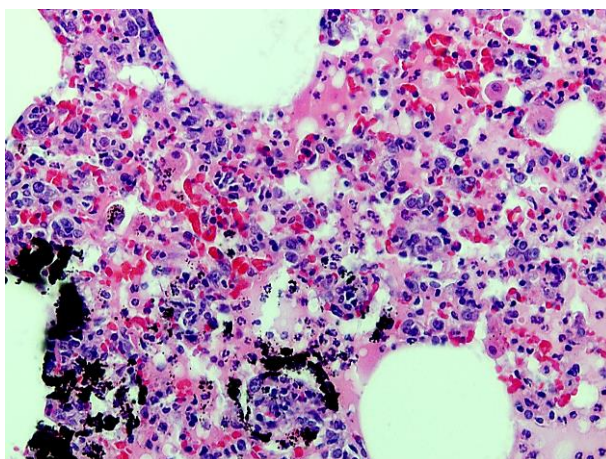


Рисунок 3 – Легкое крысы через 24 часа после однократного интратрахеального введения 50 мг наноразмерной фракции алюминия
Воспалительный инфильтрат в легочной ткани.
Окраска гематоксилин-эозин-флоксином. Общее увеличение $\times 400$

Через 3 суток после однократного введения НЧА пылевые частицы присутствовали в межуточной ткани легкого, а также в просвете легочных бронхиол (рисунок 4А). При этом воспалительные элементы были представлены преимущественно макрофагами, которые формировали макрофагальные гранулемы (рисунок 4Б).

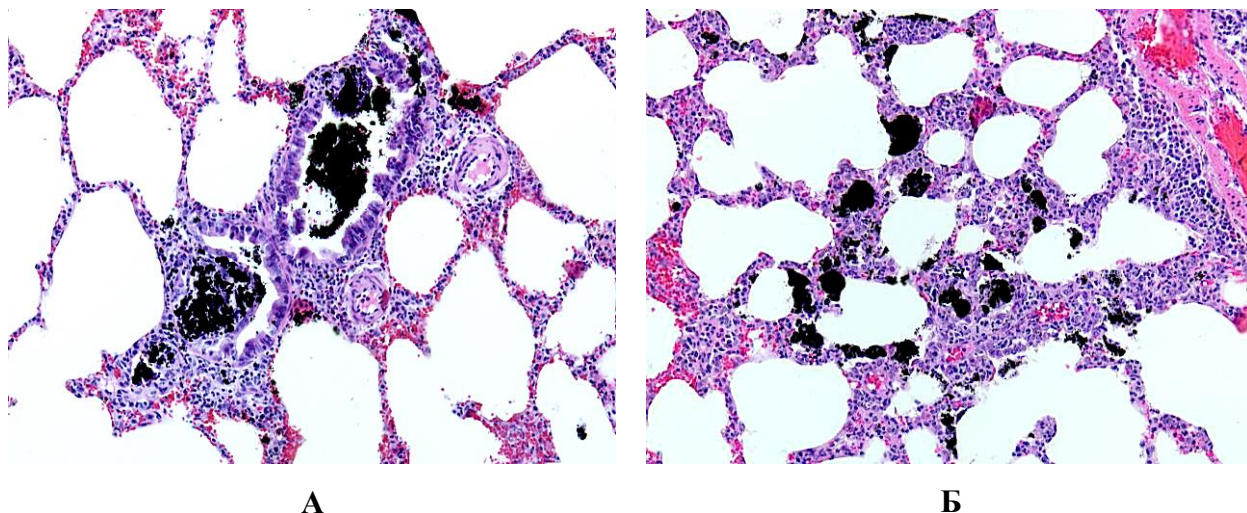


Рисунок 4 – Легкое крысы через 3 суток после однократного интратрахеального введения 50 мг наноразмерной фракции алюминия

Наличие НЧА в просвете внутрилегочных бронхиол (А), формирование макрофагальных гранул (Б)

Окраска гематоксилин-эозин-флоксином. Общее увеличение $\times 200$

При микроскопическом изучении легочной ткани животных через 7 суток после однократного введения НЧА было обнаружено присутствие пылевых частиц в нижних отделах дыхательных путей в составе гранулем, вокруг которых сформировались многослойные муфты из различного типа клеток, образуя эпителиоидно-клеточные гранулемы (рисунок 5).

Через 14 суток от начала эксперимента происходила полная трансформация и созревание гранулем, содержащих наночастицы алюминия, отграничивались от межуточной ткани легкого оболочкой, состоящей из гистиоцитарных клеток (рисунок 6).

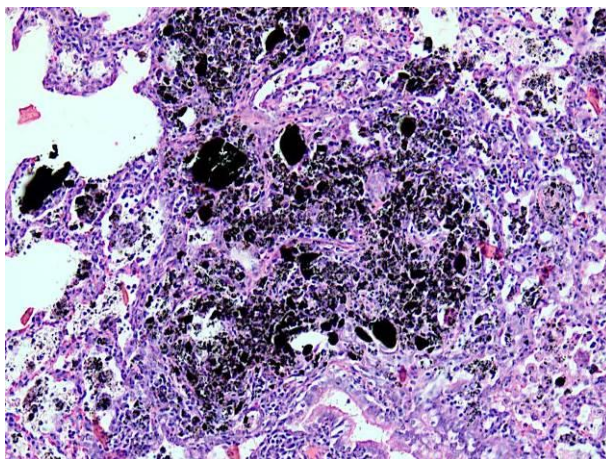


Рисунок 5 – Легкое крысы через 7 суток после однократного интратрахеального введения 50 мг наноразмерной фракции алюминия
Эпителиоидно-клеточные гранулемы, содержащие наночастицы алюминия
Окраска гематоксилин-эозин-флоксином. Общее увеличение $\times 200$

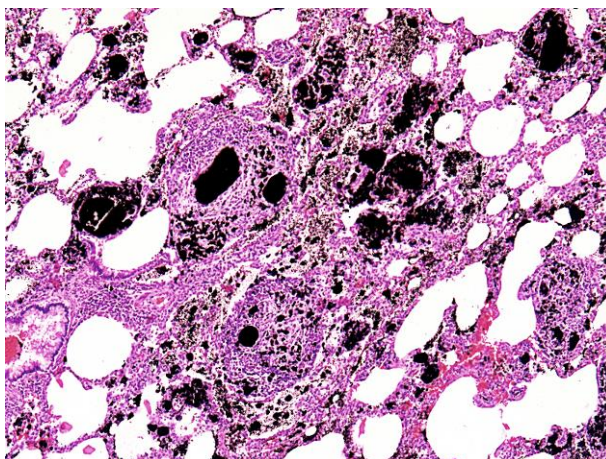


Рисунок 6 – Легкое крысы через 14 суток после однократного интратрахеального введения 50 мг наноразмерной фракции алюминия
Гранулемы, содержащие наночастицы алюминия
Окраска гематоксилин-эозин-флоксином. Общее увеличение $\times 200$

Микроскопическое изучение легочной ткани животных через 28 суток после введения наноразмерного алюминия показало, что основная масса НЧА обнаруживалась в составе крупных гранулематозных образований, отграниченных от окружающих тканей соединительно-тканной оболочкой (рисунок 7А). Также часть НЧА локализовалась в цитоплазме альвеолярных макрофагов, которые практически закупоривали просветы альвеол, в результате чего у подопытных грызунов развивалась компенсаторная легочная эмфизема.

Анализ компонентов внеклеточного матрикса показал отложения депозитов коллагена как вокруг, так и внутри пылевых гранул (рисунок 7Б).

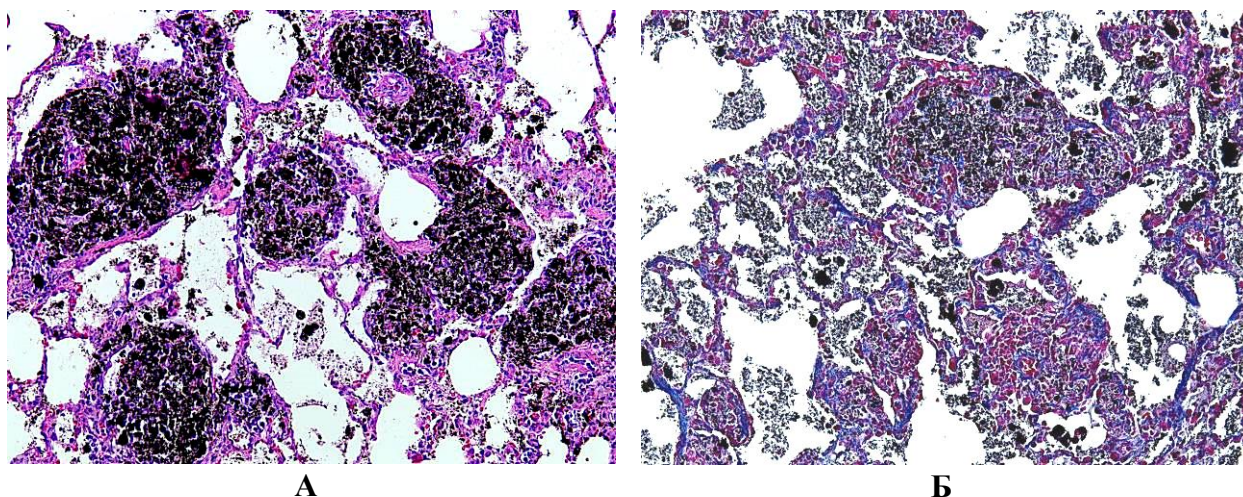


Рисунок 7 – Легкое крысы через 28 суток после однократного интратрахеального введения 50 мг наноразмерной фракции алюминия
 А – окраска гематоксилин-эозин-флоксином. Б – окраска по Masson
 Общее увеличение $\times 200$

Имеющаяся на сегодняшний день информация о негативных эффектах после воздействия алюминия в виде наноформы свидетельствует о том, что, как и в случае с микроформой, его токсичность обуславливается зависимостью «доза (концентрация) – эффект» [6]. В то же время установлено, что накопление наноформ гидрата окиси алюминия в легочной ткани и лимфоузлах зависит в большей степени от размеров агломератов, чем от дисперсности частиц [1].

Известно, что на начальном этапе гранулемы образуются как защитная реакция организма на попадание в нижние отделы дыхательных путей твердых частиц инфекционной или неинфекционной природы. Однако при длительном нахождении частиц в легочной ткани процесс приобретает патологический характер, в результате чего вокруг и внутри гранулем происходит отложение внеклеточного матрикса с исходом в фиброз легких [2], что подтверждается результатами проведенного исследования.

Так, попадание НЧА в нижние отделы дыхательных путей на ранних этапах (24 часа) инициировало острое воспаление, которое характеризовалось инфильтрацией воспалительными клетками межуточной ткани легкого, а также наличием гнойного экссудата в просвете альвеол и легочных бронхиол. В дальнейшем происходила агрегация макрофагов, НЧА и других иммунокомпетентных клеток в макрофагальные гранулемы, которые полностью трансформировались в эпителиоидно-клеточные через 14 суток после интратрахеального введения взвеси наноформы алюминия. При этом на 28 сутки эксперимента вокруг и внутри гранулем происходило отложение депозитов коллагена.

Заключение

Таким образом, динамическое наблюдение за первичными изменениями микроскопического строения легочной ткани после однократного интратрахеального введения наноразмерной формы алюминия показало, что у лабораторных животных развивался алюминоз. По морфологической форме данный вид пневмокониоза можно отнести к интерстициально-гранулематозному, а по характеру течения – к быстро прогрессирующему, т.к. формирование эпителиоидно-клеточных гранулем отмечали уже на 7 сутки после попадания НЧА нижние отделы дыхательных путей, а через 28 суток выявляли признаки фиброзного перерождения легочной ткани.

Литература

1. Pauluhn, J. Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size // Toxicology Sciences. 2009. Vol. 109, N 1. P. 152-167. doi: 10.1093/toxsci/kfp046.
2. Samsonova M.V., Chernyaev A.L. Granulomatous lung diseases. Pulmonologiya. 2017. Vol. 27, N2. P. 250-261. (In Russ.) doi: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2017-27-2-250-261>.
3. Sutunkova M.P. Experimental data and methodological considerations for justification of iron oxide nanoparticles maximum allowable concentration in occupational air. Toxicological Review. 2016. Vol. 6. P. 11-17 (In Russ.). doi: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2016-6-11-17>.
4. Zaitseva N.V., Zemlianova M.A., Zvezdin N.N., Dovbysh A.A. Toxicological and hygiene characterization of some metal-containing nanoparticles at various exposition methods: bioaccumulation and morphofunctional exposure features. Toxicological Review. 2017. Vol. 1. P. 27-34. (In Russ.). doi: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2017-1-27-34>.
5. Zaitseva N.V., Ulanova T.S., Zlobina A.V., Volkova M.V., Gileva M.I. Investigations into nanoscale particles as part of industrial aerosols and particulate matter in the air of working area. Toxicological Review. 2017. Vol 1. P. 20-26. (In Russ.). doi: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2017-1-20-26>.
6. Zemlyanova M.A., Zaitseva N.V., Ignatova A.M., Stepankov M.S. Estimation of the response of respiratory tracts to a single intra-tracheal introduction of nano- and micro-sized particles of aluminum oxide. Hygiene and Sanitation. 2019. Vol. 98, N 2. P. 196-202. (In Russ.) doi: <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-2-196-202>.