

ИЗУЧЕНИЕ МИГРАЦИИ НАНОРАЗМЕРНЫХ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ В СОСТАВЕ СУПЕРНАТАНТОВ НА МОДЕЛИ ИНБРЕДНЫХ МЫШЕЙ BALB-CJ

© 2018 г. В. В. Лабис¹, Э. А. Базилян¹, В. Н. Манских⁴, С. В. Сизова³,
С. В. Хайдуков³, И. Г. Козлов²

¹Московский государственный медико-стоматологический Университет
имени А. И. Евдокимова, Москва, Россия;

²ФГБУ «ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева»
Минздрава России, Москва, Россия;

³Институт биоорганической химии им. Акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия

⁴НИИ Митохондриологии МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Поступила: 25.05.2018. Принята: 28.06.2018

Целью настоящего исследования явилось изучение способности к миграции в иммунокомпетентные органы наноразмерных металлических частиц в составе супернатантов с целью моделирования перитонита, при внутрибрюшинном введении растворов, в частности, с индукцией и без индукции липополисахаридом. Наноразмерные металлические частицы были получены в лабораторных условиях с поверхности дентальных имплантатов «Nobel Biocare» и «Alpha BiO» в составе супернатантов. В эксперименте 12 инбредным мышам, разделенным условно на 3 группы: контроль, группа исследования 2 и группа исследования 3, — вводили растворы: антибиотика, наноразмерных частиц, полученных с двух систем дентальных имплантатов в составе супернатантов. В третьей подгруппе исследования внутрибрюшинное введение наноразмерных металлических частиц проводили с индукцией асептического воспаления с помощью липополисахарида. На 10 сутки мышам выводили из эксперимента методом декапитации и проводили забор трех органов: печени, почки и селезенки. В дальнейшем проводили гистологическое исследование с окрашиванием тканей различными красителями. В результате в 3 группе исследования, во второй подгруппе, в частности, в селезенке при окрашивании на наличие Al_2O_3 были обнаружены наночастицы на границе белой и красной пульпы внутри макрофагов.

Ключевые слова: наноразмерные металлические частицы, мышьяная модель, асептический перитонит, селезенка

DOI: 10.31857/S102872210002407-2

Адрес: 127473 Москва, «Московский медико-стоматологический университет», Лабис Варвара Владимировна.

Тел.: +74997377319, +7962977772. **E-mail:** Varvara2001@mail.ru

Авторы:

Лабис В. В., к.м.н., ассистент кафедры хирургии полости рта Московского государственного медико-стоматологического университета имени А. И. Евдокимова, Москва, Россия;

Базилян Э. А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургии полости рта стоматологического факультета Московского государственного медико-стоматологического университета им. А. И. Евдокимова, Москва, Россия;

Козлов И. Г., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева» Минздрава РФ, Москва, Россия;

Сизова С. В., к.х.н., научный сотрудник лаборатории Молекулярной биофизики, ИБХ РАН им. Акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

Хайдуков С. В., д.б.н., с. н. с. Института биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;

Манских В. Н., д.м.н., научный сотрудник, МГУ имени М. В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, лаборатория биоэнергетики клетки, Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизма остеointegrации в стоматологии проходит при использовании животной модели, в частности, мини-пиггов, что

является дорогостоящим способом, не позволяющим изучать клеточно-молекулярные параметры врожденного и адаптивного иммунитета. На сегодняшний день понимание иммунологических аспектов репаративного остеогенеза при остеоинтеграции дентальных имплантатов не может быть достигнуто без разработки адекватной патофизиологической модели, которая позволит в дальнейшем осуществить данную необходимость. Разработка супернатантов, содержащих наноразмерные металлические частицы, полученные с поверхности дентальных имплантатов, сделало возможным изучить возможность миграции наноразмерных частиц при использовании инбредных мышей линии BALB-CJ. Данная модель интраперитонеального введения супернатантов с индукцией и без индукции липополисахаридом может быть в дальнейшем модифицирована и использована для изучения цитокинового профиля провоспалительного каскада, в ответ на наноразмерные металлические частицы, полученные с поверхности «биоинертного сплава» TiO_2 , используемого при стандартном производстве медицинских изделий. Данную провоспалительную реакцию могут потенцировать наноразмерные металлические частицы, эмиссия которых может происходить с поверхности дентального имплантата как на этапе его установки, так и в процессе его эксплуатации, поскольку имеются данные о нестабильности структуры сплава на основе TiO_2 , используемого при изготовлении медицинских металлических изделий [2–4].

Исходя из этого, **целью** настоящего исследования явилось изучение способности к миграции наноразмерных металлических частиц, полученных в лабораторных условиях с поверхности дентальных имплантатов «Nobel Biocare» и «Alpha BiO», в составе супернатантов при внутрибрюшинном введении растворов на патофизиологической модели мышей с и без индукции липополисахаридом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали стерильные взвеси наноразмерных металлических частиц (НрМЧ), полученных с поверхности дентальных имплантатов фирмы «Nobel Biocare» и «Alpha BiO», а также 12 инбредных мышей линии BALB-CJ. Для осуществления заявленной модели асептического перитонита проводили внутрибрюшинное введение растворов, содержащих наноразмерные металлические частицы,

полученные в составе супернатантов, в частности, с двух систем дентальных имплантатов «Nobel Replace» и «Alpha BiO», с имитацией воспаления (введение липополисахарида (ЛПС)) и без. В качестве групп исследования 12 инбредных мышей BALB/cJ были разделены на подгруппы: контроль, группа исследования и группа исследования в условиях индукции воспаления. На инбредной мышинной модели, используемой нами в исследовании, был использован антибиотик Бициллин-5 с концентрацией 300 000 ЕД. Он был выбран в связи с его применением – 1 инъекция в 14–21 день. Концентрацией необходимой для мелких животных является 30 000 ЕД на 1 килограмм массы тела. В нашем случае мыши весили от 13 до 14 граммов. $30\,000 \times 0,013 = 390$ или $30\,000 \times 0,014 = 420$. Необходимая концентрация антибиотика – 360. Используя стерильный инструментарий и 5 мл бидистиллята, проводили разведение заявленного ранее антибиотика. Забрав 1 миллилитр антибиотика, растворяли его в 4 миллилитрах инъекционной жидкости, создав концентрацию в 5 миллилитрах равную 60 000 ($300\,000/5 = 60\,000$). Забрав в следующую пробирку 1 миллилитр раствора с концентрацией 60 000, добавляем опять 4 миллилитра инъекционной жидкости, создав тем самым концентрацию 12 000 ($60\,000/5 = 12\,000$). Проведя точно такие же манипуляции, мы приходим к концентрации равной 2 400 ($12\,000/5 = 2\,400$). Взяв 1 миллилитр с концентрацией 2 400, мы добавляем 5 миллилитров бидистиллята, добившись концентрации необходимой в исследовании ($2\,400/6 = 400$). Таким образом, первым этапом проводят инъекционное введение антибиотика всем мышам из трех групп. В группе контроля выделены 2 подгруппы мышей: двум вводили бидистиллят в количестве 1,5 мл на приготовленном растворе антибиотика 0,5 мл, 2 вводили липополисахарид (в концентрации 100 мкг сухого вещества на 1 мл бидистиллята) – 0,5 мл, разведенного на бидистилляте 1 мл и антибиотике 0,5 мл. Всего вводили 2 мл раствора внутрибрюшинно. Во второй группе исследования мышей также разделили на 2 подгруппы и вводили 2 из них: 0,5 мл антибиотика, 0,5 мл супернатанта, содержащего наноразмерные металлические частицы, полученные с поверхности дентальных имплантатов «Nobel Replace» и 1 мл бидистиллята. Всего 2 мл раствора. Двум другим мышам вводили: 0,5 мл антибиотика, 0,5 мл супернатанта, содержащего наноразмерные ме-

таллические частицы, полученные с поверхности дентальных имплантатов «Alpha BiO» и 1 мл бидистиллята. Всего 2 мл раствора. В третьей подгруппе, состоящей из 4 мышей: 2-ум вводили 0,5 мл липополисахарида, 0,5 мл антибиотика, 0,5 мл наноразмерных металлических частиц, полученных в составе супернатантов с системы дентальных имплантатов «Nobel Replase», а 2 из 4 мышей наноразмерные частицы, полученных в составе супернатантов с дентальных имплантатов системы «Alpha BiO» 0,5 мл, 0,5 мл антибиотика, 0,5 мл раствора липополисахарида и 0,5 мл бидистиллята. Всего 2 мл раствора. Через 10 дней выводили мышей из эксперимента методом декапитации и проводили забор органов: печени, селезенки и почки у каждой мыши в 10% раствор формальдегида (Порядок работы, содержание животных и их выведение из эксперимента выполняли в соответствии с приложением к приказу министра здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 года «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». При этом принимали во внимание положения Хельсинской декларации и рекомендации, содержащиеся в Директивах Европейского сообщества (86/609 ЕС). 5 Фиксированные формалином образцы отмывали в воде в течение суток, после вырезки размещали в промаркированных гистологических кассетах, дегидратировали в 7 порциях 99,7% изопропанола (Isoprep, Biovitrum), пропитывали в 2 порциях парафиновой среды (Histomix, Biovitrum) и заливали в нее. Срезы толщиной 3 мкм готовили на ротационном микротоме, монтировали на предметных стеклах и окрашивали гематоксилином Карацци и эозином по рутинному протоколу, а также с помощью метода Перлса с покраской сафранином (на железо, поскольку ранее была показана возможность выявления этим методом железосодержащих наночастиц — Plotnikov E. Y., Pul'kova N. V., Silachev D. N., Manskikh V. N., Khryapenkova T. G., Zorov D. B., Sukhikh G. T. Methods of detection of mesenchymal stem cells in the kidneys during therapy of experimental renal pathologies. Bull Exp Biol Med. 2012 154(1):145–151) и на алюминий ауристрикарбонатовой кислотой (алюминоном) по прописи Лилли без докраски метиленовым синим (описание методов см. Р. Лилли, Патогистологическая техника и практическая гистохимия, М., Мир, 1969 г., 645 с.). Параллельно производилось контрольная качественная реакция

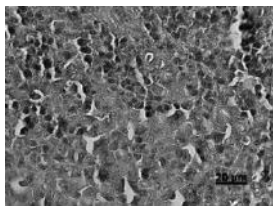
на алюминий путем смешивания используемых реактивов с сульфатом алюминия на предметном стекле и окрашивание на железо среза селезенки крысы с гемосидерозом. Положительной реакцией на алюминий считалось появление продукта реакции, окрашенного в красный цвет, частицы, содержащие железо, приобретали при специфической окраске синий цвет. Препараты изучали с помощью микроскопа AxioScope A1 (Carl Zeiss), фотографировали с помощью камеры MRc5 (Carl Zeiss) и программы AxioVision 3.0 (Carl Zeiss). Выявленные патологические изменения квалифицировали согласно общепринятой номенклатуре (В. Н. Манских, Патоморфология лабораторной мыши, Т. 1, Москва, ВАКО, 2016 г., 208 с., Т. 3, 2017 г., 434 с.). Визуальное изменение размера и цвета органов: селезенки, печени и почки, — при проведении вскрытия у мышей брюшной полости, указывало на разницу в первой, второй и третьей подгруппах, в частности, при введении липополисахарида, индуцирующего воспаление. Результаты гистологического исследования подтверждают наличие воспаления в каждом конкретном случае. Встает вопрос о разнице в выраженности воспалительного процесса, что и станет дальнейшим результатом нашего будущего исследования, на основании данного способа патофизиологической модели асептического воспаления.

РЕЗУЛЬТАТЫ

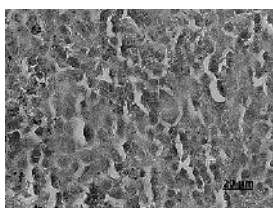
Согласно заявленной методике, был смоделирован перитонит на 12 инбредных мышах BALB/cJ, которых разделили на соответствующие группы и подгруппы. Из каждой подгруппы были проанализированы 3 органа одной мыши, всего 6 мышей, 18 органов: селезенка, печень, почка, — с помощью гистологического метода исследования. Микрофотографии всех препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином выполнены при увеличении $\times 400$, окрашенных на железо и алюминий — $\times 1000$. На препаратах печени, окрашенных гематоксилином и эозином, во всех случаях представлены гепатоциты трех зон дольки, на препаратах почки — клубочек и часть проксимальных и дистальных канальцев (кора), в селезенке — красная пульпа и фолликул (маргинальная и мантийная зоны) белой пульпы. В препаратах, окрашенных на железо и алюминий, демонстрируются гепатоциты из периферической зоны долек, в препаратах почек — клубочек и прилежащие проксимальные

и дистальные каналы, на препаратах селезенки — маргинальная зона фолликулов белой пульпы. Результаты иллюстрируются следующими фигурами:

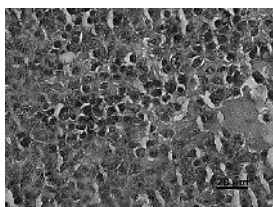
Фиг. 1. Группа 1, мышшь из 1 подгруппы (контроль). Резко выраженные явления экстрамедуллярного гемопоэза в красной пульпе селезенки, слабо выраженный экстрамедуллярный гемопоэз (гранулоцитопоэз) в печени, почка — без морфологических изменений. Депозиты частиц, содержащих алюминий и железо, в исследованных образцах не обнаружены. В образцах селезенки в красной пульпе отмечаются депозиты формалинового пигмента коричневого цвета. Слабо выраженный экстрамедуллярный гемопоэз (гранулоцитопоэз) в печени.



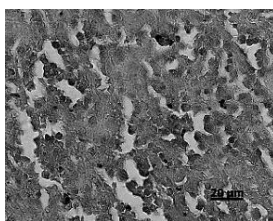
Фиг. 2. Группа 2, мышшь из 1 подгруппы. Резко выраженные явления экстрамедуллярного гемопоэза в красной пульпе селезенки, слабо выраженный экстрамедуллярный гемопоэз (гранулоцитопоэз) в печени, почка — без морфологических изменений. Депозиты частиц, содержащих алюминий и железо, в исследованных образцах не обнаружены. В образцах селезенки в красной пульпе отмечаются депозиты формалинового пигмента коричневого цвета.



Фиг. 3. Группа 2, мышшь из 2 подгруппы. Резко выраженные явления экстрамедуллярного гемопоэза в красной пульпе селезенки, слабо выраженный экстрамедуллярный гемопоэз (гранулоцитопоэз) в печени, почка — без морфологических изменений. Депозиты частиц, содержащих алюминий и железо, в исследованных образцах не обнаружены. В образцах селезенки в красной пульпе отмечаются депозиты формалинового пигмента коричневого цвета. Слабо выраженный экстрамедуллярный гемопоэз (гранулоцитопоэз) в печени.

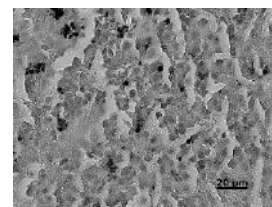


Фиг. 4. Группа 3, мышшь из 1 подгруппы. Резко выраженные явления экстрамедуллярного гемопоэза в красной пульпе селезенки, слабо выраженный экстрамедуллярный



гемопоэз (гранулоцитопоэз) в печени, почка — без морфологических изменений. Депозиты частиц, содержащих алюминий и железо, в исследованных образцах не обнаружены. В образцах селезенки в красной пульпе отмечаются депозиты формалинового пигмента коричневого цвета.

Фиг. 5. Группа 3, мышшь из 2 подгруппы. Резко выраженные явления экстрамедуллярного гемопоэза в красной пульпе селезенки, слабо выраженный экстрамедуллярный гемопоэз (гранулоцитопоэз) в печени, почка — без морфологических изменений. В маргинальной зоне фолликулов белой пульпы выявлены многочисленные клетки (макрофаги), содержащие в цитоплазме депозиты коричневого цвета, состоящие из переменного размера (менее 1 мкм) частиц, дающих резкую положительную реакцию Перльса на железо и окрашивающихся алюмином в красно-оранжевый цвет. В образцах селезенки в красной пульпе отмечаются депозиты формалинового пигмента коричневого цвета. Таким образом, только в случае группы 3 во второй подгруппе исследования были выявлены частицы, которые по своей локализации (маргинальная зона — обычное место локализации циркулировавших в кровотоке инородных частиц, захваченных макрофагами) и гистохимическим свойствам могут быть интерпретированы как наночастицы экзогенного происхождения. Морфологические проявления иммуногенеза в селезенке при этом отсутствовали.



ОБСУЖДЕНИЕ

Появились данные о нестабильности структуры сплава на основе сплава TiO_2 , используемого при изготовлении медицинских металлических изделий [2], в том числе в процессе их функционирования в организме человека.

Ранее нами экспериментально показана возможность эмиссии наноразмерных металлических частиц с поверхности дентальных имплантатов разных систем и обсуждена их роль в процессе остеоинтеграции с момента проведения операции и на последующих этапах функционирования металлических изделий в полости рта [3, 4].

При переносе на патофизиологическую мышиную модель изучения нанотехнологических аспектов тканевой репарации, можно сделать вывод о том, что наноразмерные металлические

частицы в составе разработанных нами супернатантов, имеют свойство миграции через системный кровоток. Обнаружение наночастиц алюминия при индукции воспаления липополисахаридом в иммунокомпетентном органе, таком как селезенка, указывает на эффективность разработанной нами патофизиологической мышшиной модели и делает возможным использовать ее в дальнейших иммунологических исследованиях.

Таким образом, в процессе остеоинтеграции дентальных имплантатов наноразмерные металлические частицы, по нашему мнению, могут выступать «точкой активации» и участниками иммунопатологических реакций, исходно начинающихся с асептического воспаления. Местное накопление наночастиц металлов в тканях, их контакт с сывороточными белками и, возможно, секретруемыми пептидами фагоцитирующих клеток, адгезия на них бактерий и образование биопленок способны существенно изменить характер ответной реакции иммунной системы и, очевидно, в ряде случаев приводить к срыву толерантности иммунной системы при свершившейся остеоинтеграции, возникновению патофизиологического воспаления, что приводит к таким клиническим проявлениям как убыль костной ткани. Для подтверждения данного предположения необходимо проведение дальнейших исследований, основанных на изучении

цитокинового провоспалительного каскада, что станет целью нашего следующего научного эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lafaurie G. I., Sabogal M. A., Castillo D. M., Rincón M. V., Gómez L. A., Lesmes Y. A., Chambrone L. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review // *J Periodontol*. 2017. 19: 1–26. doi: 10.1902/jop.2017.170123.
2. Shah R., Penmetsa D. S. L., Thomas R., Mehta D. S. Titanium Corrosion: Implications For Dental Implants // *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2016. 24(4): 171–180. doi: 10.1922/EJPRD_1531Shah10.
3. Лабис В. В., Базикян Э. А., Козлов И. Г., Сизова С. В., Хайдуков С. В. Наноразмерные частицы — участники остеоинтеграции // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2016. 1: 1–18. [Labis V. V., Bazikyan E. A., Kozlov I. G., Sizova S. V., Hajdukov S. V. Nanosized particles — participants of osseointegration. *Bulletin of Orenburg scientific center of UrB RAS*, 2016. 1: 1–18. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-1/Articles/LVV-2016-1.pdf>)]
4. Лабис В. В., Базикян Э. А., Сизова С. В., Хайдуков С. В., Козлов И. Г. Исследование наноразмерных частиц, полученных в супернатантах с дентальных имплантатов двух систем А и В // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2016. 2: 16с. [Labis V. V., Bazikyan E. A., Sizova S. V., Hajdukov S. V., Kozlov I. G. Nanosized particles obtained in supernatanes from dental implants of systems A and B // *Bulletin of Orenburg scientific center of UrB RAS*, 2016. 1: 1–18. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/VVL-2016-2.pdf>)]

STUDY OF MIGRATION OF NANO-DIMENSIONAL METALLIC PARTICLES IN THE COMPOSITION OF SUPERNATANTS ON THE MODEL OF INBREED MOBILES BALB-CJ

© 2018 V. V. Labis¹, E. A. Bazikyan¹, V. N. Manskih⁴, S. V. Sizova³, S. V. Khaidukov³, I. G. Kozlov²

¹Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A. I. Evdokimov, Moscow, Russia

²FGBU “FNKTS children’s hematology, oncology and immunology. D. Rogachev »

Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

³Institute of Bioorganic Chemistry named by Academicians M. M. Shemyakin and Y. A. Ovchinnikov, RAS, Moscow, Russia

⁴The Institute of Mitoengineering of MV Lomonosov Moscow State University. Lomonosov, Moscow, Russia

Received: 25.05.2018. Accepted: 28.06.2018

The purpose of this study was to investigate the ability of migration into the immunocompetent organs of nanoscale metal particles in the composition of supernatants. The goal is to model peritonitis, with intraperitoneal administration of solutions, in particular, with induction and without induction by lipopolysaccharide. Nanoscale metal particles were obtained in the laboratory from the surface of the dental implants “Nobel Biocare” and “Alpha BiO” in the composition of supernatants. In the experiment, 12 inbred mice, divided conditionally into 3 groups were injected with solutions: antibiotic, nanoscale particles obtained from two systems of dental implants in supernatants. On day 10 three organs were examined: the liver, kidney and spleen. A histological study indicated the presence of Al₂O₃, nanoparticles, found on the boundary between white and red pulp inside macrophages in the group injected with supernatants taken from «Alpha BIO» surface.

Key words: nanoscale metal particles, mouse model, aseptic peritonitis, spleen

Authors:

Labis V. V., ✉ Ph.D, assistant of the Department of Oral Surgery, Moscow State Medical-Stomatological University named after A. I. Evdokimova, Moscow, Russia;

127473 Moscow, State Medical-Stomatological University named after A. I. Evdokimova. Phone: +74997377319, +79629777772.

E-mail: Varvara2001@mail.ru;

Bazikyan E. A., MD, Professor, Head of the Department of Oral Surgery, Dental Faculty, Moscow State Medical-Stomatological University. A. I. Evdokimova, Moscow, Russia;

Kozlov I. G., MD, Professor, Head of Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, FGBU “FNKTS children’s hematology, oncology and immunology. D. Rogachev, Moscow, Russia;

Sizova S. V., Ph.D., research associate of the laboratory, Laboratory of Molecular Biophysics, IBCh RAS im. Acad. M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

Hajdukov S. V., MD., Senior Researcher of the Institute of Bioorganic Chemistry. acad. M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

Manskih V. N., MD, research associate, Moscow State University named after MV Lomonosov. Lomonosov Research Institute of Physico-Chemical Biology, named after A. N. Belozersky, a laboratory of bioenergetics cells, Moscow, Russia.