



Сахаутдинова Р.Р., Рябова Ю.В., Панов В.Г., Минигалиева И.А., Сутункова М.П.,
Бушуева Т.В.

Применение оттискной цитологии в оценке иммунологических эффектов изолированного и комбинированного действия наночастиц селена и меди

ФБУН «Екатеринбургский медицинский – научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 620014, Екатеринбург,
Россия

Введение. Touch Imprint Cytology – метод оттискной цитологии мазков-отпечатков имеет большое диагностическое значение не только в клинической практике, а также представляет интерес и в качестве экспресс-метода оценки иммунологических эффектов влияния металлосодержащих наночастиц (Me-НЧ) на ткани лабораторных животных в эксперименте.

Материалы и методы. Проанализированы селезенка и брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ) аутбредных крыс-самцов (24 особи, по 6 крыс в каждой группе, включая контроль), с начальной массой тела 220–230 г, после субхронической интоксикации, которая была вызвана многократными внутривенными инъекциями НЧ SeO в дозе 0,5 мг/кг и НЧ CuO в дозе 0,5 мг/кг и их комбинации 3 раза в неделю (всего 18 введений), диаметром ($\pm$ стандартное отклонение) для НЧ SeO – 51 ± 14 нм, для НЧ CuO – 21 ± 4 нм. После умерщвления крыс декапитацией у животных из каждой группы извлекали селезенку и БЛУ. С селезенки и БЛУ делали оттиски на предметные стекла. Использовали метод окрашивания по Лейшману. Цитоморфологические признаки изучали в световом бинокулярном микроскопе Carl Zeiss Primo Star с системой визуализации видеокамерой USCMOS при увеличении $\times 100$ и $\times 1000$ в соответствии с принятыми критериями. Подсчет клеток при анализе препаратов селезенки и БЛУ проводили в процентах – 100 клеток с каждого мазка (48 исследований), а также с расчетом числа клеточных элементов на 1 мм^2 площади поверхности мазка, путем подсчета абсолютного количества каждого клеточного элемента на поле зрения микроскопа $0,03 \text{ мм}^2$, с последующим пересчетом на 1 мм^2 (количество исследований 48). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Excel. Данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента. Различия сравниваемых результатов считали достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Приведены основные результаты, полученные при изучении цитоморфологических показателей мазков-отпечатков селезенки и БЛУ крыс после воздействия металлосодержащих наночастиц селена и меди как изолированно, так и их комбинации с применением двух методов подсчета клеточного состава препаратов. Выделены основные изменения клеточного состава при формировании иммунологических эффектов. Выявлены воспалительные реакции гиперергического типа при воздействии наночастиц селена как при автономном воздействии, так и при комбинации с наночастицами меди. Отмечено формирование местного клеточного иммунитета за счет увеличения уровня плазмоцитов в мазках-отпечатках при воздействии наночастиц меди.

Заключение. Применение оттискного метода мазков-отпечатков совместно с гистологическим исследованием тканевых препаратов позволяет дать наиболее полный анализ цитоморфологических показателей при исследовании иммунологических эффектов металлосодержащих наночастиц.

Ключевые слова: цитоморфология; крысы; селезенка; лимфатический узел; наночастицы

Для цитирования: Сахаутдинова Р.Р., Рябова Ю.В., Панов В.Г., Минигалиева И.А., Сутункова М.П., Бушуева Т.В. Применение оттискной цитологии в оценке иммунологических эффектов изолированного и комбинированного действия наночастиц селена и меди. Гигиена и санитария. 2021; 100(12): 1502–1507. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1502-1507>

Для корреспонденции: Бушуева Татьяна Викторовна, канд. мед. наук, зав. научно-производственным отделом лабораторно-диагностических технологий ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург. E-mail: bushueva@ymrc.ru

Участие авторов: Бушуева Т.В. – концепция и дизайн исследования, написание текста; Сахаутдинова Р.Р. – сбор и обработка материала, написание текста; Рябова Ю.В. – сбор и обработка материала; Панов В.Г. – статистическая обработка; Сутункова М.П., Минигалиева И.А. – редактирование. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Заключение комитета по биомедицинской этике: исследования одобрены ЛЭК ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП, номер протокола № 2 от 20.04.2021 г.

Поступила: 06.10.2021/ Принята к печати: 25.11.2021 / Опубликована: 30.12.2021

Renata R. Sakhautdinova, Iuliia V. Riabova, Vladimir G. Panov, Ilzira A. Minigalieva,
Marina P. Sutunkova, Tatyana V. Bushueva

Application of imprint cytology in assessment of immunological effects of isolated and combined action of selenium and copper nanoparticles

Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, Russian Agency
for Consumer Rights Protection, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation

Introduction. Touch Imprint Cytology as the method of impression cytology of smears-prints is of great diagnostic value not only in clinical practice but is also of interest as an express method for assessing the immunological effects of the influence of metal-containing nanoparticles on the tissues of laboratory animals in an experiment.

Materials and methods. The study involved the spleen and mesenteric lymph nodes (MLN) of outbred male rats (24 individuals), with an initial weight of 220–230 g, after subchronic intoxication, which was caused by repeated intraperitoneal injections of metal-containing nanoparticles of selenium (SeO) and copper (CuO) nanoparticles (NPs) at a dose of 0.5 mg/kg and their combination three times a week (a total of 18 injections). After sacrificing the rats by decapitation, the spleen and MLN were removed from the animals from each group; made smears were dried at room temperature. Stained according to

Leishman. Cell composition and cytological signs were assessed in a light binocular microscope by Carl Zeiss Primo Star with a USCMOS video imaging system at a magnification of 100x and 1000x under cytological criteria. Cell counting in the analysis of spleen and MLN preparations was carried out in percentage — 100 cells from each smear (48 studies), as well as calculating the number of cellular elements per 1 mm² of the smear surface area, by calculating the absolute amount of each cellular element in the microscope field of view of 0.03 mm², followed by recalculation per 1 mm² (the number of studies is 48). Differences between the mean group quantitative results were processed using Student's criteria using Excel software. Differences between mean values were considered statistically significant if the probability of a random difference did not exceed 5% ($p < 0.05$).

Results. The main results obtained in the study of cytomorphological parameters of smears — spleen prints and MLN of rats after exposure to SeO and CuO NPs, both independently and their combination using two methods for calculating the cellular composition of preparations, are presented. The main changes in the cellular composition during immunological effects are highlighted. Inflammatory reactions of the hyperergic type were revealed when exposed to selenium nanoparticles, both in autonomous action and in combination with copper nanoparticles. The formation of local cellular immunity was noted due to an increase in the level of plasma cells in smears imprints when exposed to copper nanoparticles.

Conclusion. Using the impression method of smears-prints in conjunction with the histological examination of tissue preparations allows implementing complete cytomorphological parameters in studying the immunological effects of metal-containing nanoparticles.

Keywords: cytomorphology; rats; spleen; lymph node; nanoparticles

For citation: Sakhautdinova R.R., Riabova Iu.V., Panov V.G., Minigalieva I.A., Sutunkova M.P., Bushueva T.V. Application of imprint cytology in assessment of immunological effects of isolated and combined action of selenium and copper nanoparticles. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100(12): 1502–1507. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1502-1507> (In Russ.)

For correspondence: Tatyana V. Bushueva, MD, PhD, Head of Laboratory Diagnostics Department, Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, Russian Agency for Consumer Rights Protection, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation. E-mail: bushueva@ymrc.ru

Information about authors:

Sakhautdinova R.R., <https://orcid.org/0000-0002-2726-9259>

Riabova Iu.V., <https://orcid.org/0000-0003-2677-0479>

Panov V.G., <https://orcid.org/0000-0061-6718-3217>

Minigalieva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-0097-7845>

Sutunkova M.P., <https://orcid.org/0000-0002-1743-7642>

Bushueva T.V., <https://orcid.org/0000-0002-5872-2001>

Contribution: Bushueva T.V. — design of the study, text writing; Sakhautdinova R.R. — data collection, data processing, text writing; Riabova Iu.V. — the collection and processing of the material; Panov V.G. — statistics; Sutunkova M.P., Minigalieva I.A. — editing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

The conclusion of the committee on biomedical ethics: the Local Ethics Committee of the Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, Russian Agency for Consumer Rights Protection, Yekaterinburg, 620014, Russian Federation approved this study, protocol number 2 of 20.04.21.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received: October 6, 2021 / Accepted: November 25, 2021 / Published: December 30, 2021

Введение

Метод оттисковой цитологии мазков-отпечатков Touch Imprint Cytology имеет большое диагностическое значение для быстрой интраоперационной оттисковой диагностики при проведении хирургического лечения онкологических пациентов, поверхностных вирусных инфекций в офтальмологической практике [1–3]. Этот метод показал хорошую сходимость с результатами гистологических исследований, продемонстрированную в медицинских отчётах по изучению меланоцитарной опухоли конъюнктивы [4]. Данный метод стал надёжным дополнением к гистологическим препаратам благодаря своей простоте и экономической эффективности. Надёжную сопоставимость показали результаты, полученные при анализе отпечатков, сделанных как из свежих срезов тканей, так и из замороженных блоков [5, 6]. Результаты оттисковой цитологии находят своё применение в токсикологических исследованиях для оценки органоспецифических токсических эффектов металлосодержащих наночастиц в субхронических экспериментах наряду с морфологической оценкой гистологических препаратов [7–9]. В литературе встречаются единичные отчёты по применению Touch Imprint Cytology для оценки реакции иммунокомпетентных органов (лимфоузлы, селезёнка) на воздействие фармацевтическими препаратами и токсическими веществами [10, 11]. По данным литературы, селен и кадмий — тяжёлые металлы, которые поступают в организм из окружающей среды с продуктами питания, водой, сигаретным дымом, а также содержатся в воздухе производственных помещений на предприятиях цветной металлургии, производстве красок, строительстве, электронной промышленности. Доза, путь поступления, индивидуальная чувствительность определяют разнонаправленность эффектов селена и меди и затрудняют интерпретацию результатов иммунологических наблюдений [12, 13]. В экспериментальных исследованиях на лабораторных животных зафиксированы множественные иммуноотропные эффекты меди и селена, характеризующиеся активацией клеточного и гуморального иммунитета [14]. Однако возможности метода Touch Imprint Cytology для изучения изолированного и комбинированного влияния нано-

частиц селена и меди на иммунокомпетентные органы недостаточно представлены в медицинской литературе.

Цель работы — изучить возможность применения метода тканевых отпечатков (сенсорных препаратов) для изучения иммунологических эффектов воздействия наночастиц селена и меди.

Таким образом, метод оттисковой цитологии достаточно известен и широко применяется в клинической практике, не менее интересен он и в качестве экспресс-метода оценки цитоморфологических показателей влияния металлосодержащих наночастиц на иммунокомпетентные органы лабораторных животных. Стоит отметить, что при изучении иммунологических эффектов наночастиц данный метод ранее не описывался, и данная техника впервые была применена нашим коллективом в исследовании токсичности Me-NЧ. На наш взгляд, интерес представляет сравнительный анализ цитоморфологических характеристик клеток в препаратах мазков-отпечатков селезёнки и БЛУ, полученных в ходе эксперимента по изучению иммунологических эффектов металлосодержащих наночастиц селена и меди на примере субхронического внутрибрюшинного их введения в эксперименте.

Материалы и методы

Проанализированы селезёнка и БЛУ аутобредных крыс-самцов (24 особи), с начальной массой тела 220–230 г, после субхронической интоксикации, которая была вызвана многократными внутрибрюшинными инъекциями НЧ SeO в дозе 0,5 мг/кг и НЧ CuO в дозе 0,5 мг/кг и их комбинации 3 раза в неделю (всего 18 введений). Суспензии наночастиц получали с помощью лазерной абляции из тонкой листовой мишени (99,99% чистоты) под слоем стерильной деионизированной воды. По данным сканирующей электронной микроскопии, НЧ имели форму, близкую к сферической, со средним диаметром ($\pm$ стандартное отклонение) для НЧ SeO — 51 ± 14 нм, для НЧ CuO — 21 ± 4 нм.

После умерщвления крыс декапитацией у животных из каждой группы извлекали селезёнку и БЛУ. С селезёнки и БЛУ делали оттиски на предметные стёкла. Использовали метод окрашивания по Лейшману. Цитоморфологические

Таблица 1 / Table 1

Цитоморфологические показатели клеточных препаратов селезёнки крыс через 1 сут после 18-кратного субхронического, внутрибрюшинного, изолированного и комбинированного воздействия SeO-HЧ, CuO-HЧ, в процентах от общего количества клеток и на 1 мм² площади мазка-отпечатка ($\bar{X}_{cp} \pm S_x$)

Cytomorphological parameters of rat spleen cell preparations one day after 18-fold subchronic intraperitoneal isolated and combined exposure to SeO-NPs, CuO-NPs as a percentage of the total number of cells and on 1 mm² of the smear-print area ($\bar{X}_{av} \pm S_x$)

Показатель Indices		Контроль Control	SeO-HЧ SeO-NPs	CuO-HЧ CuO-NPs	SeO-HЧ + CuO-HЧ SeO-NPs + CuO-NPs
<i>в процентах от общего количества клеток / as a percentage of the total number of cells</i>					
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты	Mature lymphocytes and prolymphocytes	88.00 ± 0.86	83.17 ± 1.58*	77.83 ± 0.87*	79.17 ± 1.05*
Лимфоциты	Lymphoblasts	1.17 ± 0.17	1.17 ± 0.17	1.00 ± 0.00	1.50 ± 0.22
Плазмоциты	Plasmocytes	1.33 ± 0.21	2.17 ± 0.40	3.17 ± 0.31*	4.17 ± 0.79*
Макрофаги	Macrophages	1.17 ± 0.17	1.50 ± 0.22	2.00 ± 0.37	1.17 ± 0.17
Нейтрофилы	Neutrophils	5.50 ± 0.56	7.17 ± 0.95	10.17 ± 0.87*	9.33 ± 0.71*
Эозинофилы	Eosinophils	2.83 ± 0.54	4.83 ± 0.75*	5.67 ± 0.92*	4.67 ± 0.56*
<i>на 1 мм² площади мазка-отпечатка / per 1 mm² of the smear-print area</i>					
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты	Mature lymphocytes and prolymphocytes	8,227.78 ± 30.33	8,244.44 ± 71.32	8,266.67 ± 35.49	7,822.22 ± 134.62*
Лимфоциты	Lymphoblasts	38.89 ± 5.56	33.6 ± 0.05	33.8 ± 0.023	33.4 ± 0.017
Плазмоциты	Plasmocytes	122.22 ± 14.05	150.00 ± 11.39	216.67 ± 18.76*	116.67 ± 7.45*
Макрофаги	Macrophages	77.78 ± 7.03	77.78 ± 7.03	77.78 ± 7.03	83.33 ± 11.39
Нейтрофилы	Neutrophils	205.56 ± 15.91	266.67 ± 14.91*	283.33 ± 14.27*	205.56 ± 10.24*
Эозинофилы	Eosinophils	161.11 ± 10.24	188.89 ± 11.11	211.11 ± 14.05*	177.78 ± 16.48

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — статистически значимые различия от контрольной группы (при $p < 0,05$ по t -критерию Стьюдента).
Note. Here and in tables 2: * — marked values statistically significantly different from the control group (at $p < 0.05$ according to Student's t -test).

признаки изучали в световом бинокулярном микроскопе Carl Zeiss Primo Star с системой визуализации видеоканалом USC MOS при увеличении $\times 100$ и $\times 1000$ в соответствии с принятыми критериями. Подсчёт клеток при анализе препаратов селезёнки и ЛУ проводили в процентах — 100 клеток с каждого мазка (48 исследований), а также с расчётом числа клеточных элементов на 1 мм² площади поверхности мазка, путём подсчёта абсолютного количества каждого клеточного элемента на поле зрения микроскопа 0,03 мм², с последующим пересчётом на 1 мм² (количество исследований 48) [15, 16]. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Excel. Данные обрабатывали статистически с применением t -критерия Стьюдента. Различия сравниваемых результатов считали достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

В данной работе мы впервые провели оценку изменения иммунологических эффектов при анализе цитоморфологических показателей клеток селезёнки и БЛУ крыс при субхронических нанointоксикациях не только с применением гистологических исследований препаратов, но и использовали технику оттисковой цитологии с применением подсчёта как в процентах, так и в пересчёте на 1 мм² площади мазка-отпечатка.

Селезёнка как орган иммунной системы играет важную роль в механизмах развития иммунопатологических процессов. Анализ цитоморфологических показателей структур селезёнки необходим как в клинических, так и в лабораторных исследованиях. Также известно, что в разных отделах селезёнки отмечены популяции макрофагов, которые выполняют функции, согласно их расположению [17–21]. Белая пульпа представлена преимущественно скоплениями лимфоцитов, единичными ретикулярными клетками и ма-

крофагами. В тяжёлых Бильрот красной пульпы локализуются лимфоциты, макрофаги, эозинофилы и плазмоциты.

При анализе полученных результатов цитоморфологических показателей, которые представлены в табл. 1, отмечено статистически значимое уменьшение количества зрелых лимфоцитов в группах SeO-HЧ, CuO-HЧ и их комбинации по сравнению с контролем. Наблюдалось увеличение уровня плазмоцитов, нейтрофилов и эозинофилов в группах с CuO-HЧ и CuO-HЧ + SeO-HЧ.

При анализе результатов, полученных на 1 мм², которые представлены в табл. 1, также отмечены статистически значимые изменения количества плазмоцитов, нейтрофилов и эозинофилов в группах воздействия CuO-HЧ и SeO-HЧ + CuO-HЧ по сравнению с контролем. Однако дополнительно наблюдалось увеличение количества нейтрофилов в группе с SeO-HЧ, что не было выявлено при подсчёте клеточных элементов в процентах.

Для оценки реакции иммунокомпетентных органов были подготовлены мазки-отпечатки брыжеечных лимфатических узлов. Как известно, лимфатический узел в основном состоит из лимфоидных элементов [22–26]. Редко в мазках находят единичные лимфоциты. Остальные клеточные элементы, такие как ретикулярные, плазматические клетки, макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы, составляют 2–5% от клеточного состава препарата. При анализе полученных результатов в тканевых отпечатках брыжеечных лимфоузлов, которые представлены в табл. 2, обращает на себя внимание, что суммарная доля зрелых лимфоцитов и пролимфоцитов в группе (CuO-HЧ) значимо меньше, чем в группе контроля, за счёт достоверного увеличения относительного количества плазмоцитов и эозинофилов. Такие же изменения мы наблюдаем при комбинации (SeO-HЧ + CuO-HЧ). За счёт близкого расположения к месту введения суспензии, содержащей наночастицы, брыжеечные лимфоузлы, по-видимому, являются органом, формирующим первичную иммунологическую реакцию, ограничивающую распространение наночастиц.

Таблица 2 / Table 2

Цитоморфологические показатели клеточных препаратов внутрибрюшинных лимфатических узлов крыс через 1 сут после 18-кратного субхронического, внутрибрюшинного, изолированного и комбинированного воздействия SeO-НЧ, CuO-НЧ, в процентах от общего количества клеток и на 1 мм² площади мазка-отпечатка ($\bar{X}_{cp} \pm S_x$)

Cytomorphological parameters of cell preparations of intraperitoneal lymph nodes of rats one day after 18-fold subchronic intraperitoneal isolated and combined exposure to SeO-NPs, CuO-NPs as a percentage of the total number of cells and on 1 mm² of the smear-print area ($\bar{X}_m \pm S_x$)

Показатель Indices		Контроль Control	SeO-НЧ SeO-NPs	CuO-НЧ CuO-NPs	SeO-НЧ + CuO-НЧ SeO-NPs + CuO-NPs
<i>в процентах от общего количества клеток / as a percentage of the total number of cells</i>					
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты	Mature lymphocytes and prolymphocytes	92.80 ± 0.86	90.17 ± 0.91	88.40 ± 0.51*	89.60 ± 0.68*
Лимфоциты	Lymphoblasts	1.20 ± 0.20	1.00 ± 0.00	1.60 ± 0.24*	1.00 ± 0.00
Плазмоциты	Plasmocytes	1.20 ± 0.20	1.17 ± 0.17	5.40 ± 0.51*	5.60 ± 0.68*
Макрофаги	Macrophages	1.20 ± 0.20	1.50 ± 0.22	1.60 ± 0.24	1.40 ± 0.24
Нейтрофилы	Neutrophils	2.40 ± 0.68	2.00 ± 0.26	1.40 ± 0.24	1.20 ± 0.20
Эозинофилы	Eosinophils	1.20 ± 0.20	4.17 ± 0.65	1.60 ± 0.24*	1.20 ± 0.20*
<i>на 1 мм² площади мазка-отпечатка / per 1 mm² of the smear-print area</i>					
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты	Mature lymphocytes and prolymphocytes	9,866.67 ± 143.37	9,977.78 ± 114.72	9,773.33 ± 43.97*	10,006.67 ± 101.32*
Лимфоциты	Lymphoblasts	33.33 ± 0.00	38.89 ± 5.56	33.33 ± 0.00	33.33 ± 0.00
Плазмоциты	Plasmocytes	86.67 ± 8.16	88.89 ± 7.03	213.33 ± 17.00*	233.33 ± 14.91*
Макрофаги	Macrophages	40.00 ± 6.67	61.11 ± 5.56*	66.67 ± 10.54	80.00 ± 8.16*
Нейтрофилы	Neutrophils	60.00 ± 6.67	55.56 ± 11.11	86.67 ± 13.33	60.00 ± 12.47
Эозинофилы	Eosinophils	93.33 ± 12.47	172.22 ± 10.24*	93.33 ± 12.47	93.33 ± 12.47

При анализе мазков отпечатков брыжеечных лимфатических узлов после субхронического воздействия CuO-НЧ как отдельно, так и в комбинации с SeO-НЧ отмечены статистически значимые процентные сдвиги количества эозинофилов по сравнению с группой контроля.

Однако при подсчёте клеточных элементов на 1 мм² были получены дополнительные сведения о изменении цитоморфологических показателей, которые представлены в табл. 2. Во всех опытных группах при воздействии наночастиц наблюдалось статистически значимое увеличение количества макрофагов в сравнении с контрольной группой, что свидетельствует о заинтересованности фагоцитирующих элементов при формировании иммунологических эффектов. Дополнительно отмечено статистически значимое увеличение количества эозинофилов в группе при воздействии SeO-НЧ. Остальные изменения были идентичны, как и при подсчёте клеточных элементов в процентах.

Обсуждение

Полученные результаты по способности SeO-НЧ и CuO-НЧ вызывать запуск сигнальных каскадов в иммунокомпетентных клетках и, как следствие, активацию или супрессию иммунного ответа не противоречат данным, которые описаны ранее в экспериментальных работах зарубежных авторов [27, 28]. Селезёнка и лимфатические узлы участвуют в формировании адаптивного и врождённого иммунитета, являясь звеном иммунного надзора. В проведённом эксперименте выявлено снижение относительного количества зрелых лимфоцитов при изолированном и комбинированном воздействии SeO-НЧ и CuO-НЧ в препаратах мазков-отпечатков при сравнении с контролем, что совпадает с Т-клеточной иммуносупрессией, определяемой методом проточной цитометрии и описанной разными авторами при воздействии металлосодержащих наночастиц меди [29]. При анализе полученных результатов наиболее ценной является

информация не только о наличии сдвигов клеточных элементов относительно друг друга, выраженная в процентах к общему количеству клеток в препарате, а ещё и возможность оценить истинное количество разных форменных элементов, несущих определённую функциональную нагрузку, поэтому был проведён подсчёт абсолютного количества изучаемых параметров на 1 мм². Подсчёт абсолютного количества лимфоцитов на 1 мм² также показал достоверное снижение, но только при комбинированном воздействии. При изучении цитологических препаратов был отмечен сдвиг в сторону увеличения количества макрофагов как в селезёнке, так и в лимфатических узлах. Такие же изменения наблюдались и при подсчёте клеточных элементов на 1 мм², что свидетельствует о сопоставимости двух методов подсчёта. Данные показатели свидетельствуют о запуске иммунного ответа в органах, выполняющих дренажную функцию и расположенных рядом с местом поступления наночастиц при внутрибрюшинном введении. Следует отметить, что макрофаги могут выполнять не только защитную функцию, но и оказывают повреждающее действие на клетки всего организма за счёт высвобождения в общую циркуляцию провоспалительных цитокинов и стимуляции образования активных форм кислорода [30–33]. При формировании иммунологических эффектов Т- и В-лимфоцитов недостаточно. Антитела образуются путём взаимодействия дополнительного вида клеток, которыми являются макрофаги. Взаимодействие трёх видов клеток приводит к дифференцировке лимфоцитов в плазмочит с последующим образованием антител [34]. При внутрибрюшинном введении SeO-НЧ, CuO-НЧ и их комбинации отмечается эозинофилия в мазках-отпечатках селезёнки и брыжеечных лимфатических узлов. Однако в литературе представлены экспериментальные данные о преимущественной активации Т-клеточного, но не гуморального иммунного ответа при введении наночастиц селена, такое расхождение полученных результатов, возможно, связано с разными химическими соединениями селена (в нашем

случае — оксид селена), обладающими разной иммунологической активностью [35]. Воздействие наночастиц оксида селена способствовало притоку нейтрофилов в брыжеечные лимфоузлы (достоверное увеличение количества нейтрофилов в группе с SeO-NЧ на 1 мм²), однако говорить о развитии токсического воспаления гиперергического типа рано, так как мало данных о механизмах развития этого процесса, и требуются дополнительные исследования [36].

Выводы

1. Результаты цитологического исследования мазков-отпечатков селезенки и лимфатических узлов могут быть применены в изучении защитной реакции иммунокомпетентных органов при воздействии металлосодержащих наночастиц.

2. Применение подсчёта клеточных элементов на 1 мм² совместно с анализом процентных сдвигов клеточных элементов даёт наиболее полную картину при исследовании иммуотоксических эффектов Me-NЧ.

3. При анализе результатов процентного подсчёта клеточных элементов мазков-отпечатков селезенки отмече-

но статистически значимое уменьшение количества зрелых лимфоцитов в группах SeO-NЧ, CuO-NЧ и их комбинации по сравнению с контролем. При интерпретации результатов, полученных при подсчёте клеточных элементов на 1 мм², выявлено статистически значимое увеличение количества плазмочитов, нейтрофилов и эозинофилов в группах воздействия CuO-NЧ и SeO-NЧ + CuO-NЧ.

4. Отмечено статистически значимое процентное увеличение количества плазмочитов и эозинофилов в мазках-отпечатках БЛУ при воздействии CuO-NЧ и SeO-NЧ + CuO-NЧ по сравнению с контролем. При подсчёте клеточных элементов на 1 мм² были получены дополнительные сведения о изменении цитоморфологических показателей. Во всех опытных группах при воздействии наночастиц наблюдали статистически значимое увеличение количества макрофагов в сравнении с контрольной группой, также отмечено статистически значимое увеличение количества эозинофилов в группе при воздействии SeO-NЧ.

5. Полученные данные по увеличению количества фагоцитирующих элементов и плазмочитов в изучаемых органах позволяют судить о формировании защитной реакции при изучении воздействия Me-NЧ при разных концентрациях.

Литература

(п.п. 1, 4, 5, 7, 9, 12–15, 18, 19, 21–26, 28, 29, 31, 32, 35, 36 см. References)

- Петрова А.С., Птохова М.П. *Руководство по цитологической диагностике опухолей человека*. М.: Медицина; 1976.
- Ташке К. *Введение в количественную цито-гистологическую морфологию*. Бухарест; 1980.
- Кругликов Г.Г., Суслов В.Б. Особенности функциональной морфологии клеток на отпечатках органов, пленочных препаратах соединительной ткани и мазках крови. *Медико-биологические проблемы*. 2014; (4): 86–92.
- Глушкова А.В., Радилов А.С., Дулов С.А. Особенности проявления токсичности наночастиц. *Гигиена и санитария*. 2011; 90(2): 81–6.
- Гонохова М.Н., Бойко Т.В., Ельцова А.А. Сравнительная цитоморфологическая характеристика селезенки крыс при воздействии пестицидов. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; (6): 1056.
- Досынбаева Г.Н. Цитоморфологическая оценка клеток бронхоальвеолярного лаважа, печени и желудка при воздействии хлопковой пыли, содержащей фосфорорганические пестициды в эксперименте. *International Scientific and Practical Conference World Science*. 2016; 3(5): 22–30.
- Автандилов Г.Г. *Медицинская морфометрия. Руководство*. М.: Медицина; 1990.
- Абрамов М.Г. *Клиническая цитология*. М.: Медицина; 1974.
- Шабалова И.П. Современные возможности и перспективы клинической цитологии. *Новости клинической цитологии России*. 2014; 18(1–2): 64.
- Мильто И.В., Михайлов Г.А., Ратькин А.В., Магаева А.А. Влияние наноразмерных частиц на морфологию внутренних органов мыши при внутривенном введении раствора нанопорошка Fe₃O₄. *Бюллетень сибирской медицины*. 2008; 7(1): 32–6.
- Лямина С.В., Малышев И.Ю. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа. *Фундаментальные исследования*. 2014; (10–5): 930–5.
- Элбакидзе Г.М. Механизмы протекторного действия активированных эндотоксином клеток Купфера на гепатоциты. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012; 67(5): 48–54. <https://doi.org/10.15690/vramn.v67i5.274>
- Бурмистер Г.Р., Пецутто А., Улрихс Т., Айхер А. *Наглядная иммунология*. Пер. с англ. М.: Лаборатория знаний; 2009.
- Nelson J.D. Impression cytology. *Cornea*. 1988; 7(1): 71–81.
- Petrova A.S., Ptokhova M.P. *Guidelines for the Cytological Diagnosis of Human Tumors [Rukovodstvo po tsitologicheskoy diagnostike opukholey cheloveka]*. Moscow: Meditsina; 1976. (in Russian)
- Tashke K. *Introduction to Quantitative Cytological Histological Morphology [Vvedenie v kolichestvennyuyu tsito-gistologicheskuyu morfologiyu]*. Bukharest; 1980. (in Russian)
- Barbosa R.H., Dos Santos M.L.B., Silva T.P., Rosa-Fernandes L., Pinto A.M.V., Spínola P.S., et al. Impression cytology is a non-invasive and effective method for ocular cell retrieval of Zika infected babies: perspectives in OMIC studies. *Front. Mol. Neurosci*. 2019; 12: 279. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00279>
- Khalid A., Haque A.U. Touch impression cytology versus frozen section as intraoperative consultation diagnosis. *Int. J. Pathol*. 2018; 2(2): 63–70.
- Dieter G.G., Suslov V.B. Features of functional morphology of cells on prints of organs, film samples of connective tissue and blood smears. *Mediko-biologicheskie problemy*. 2014; (4): 86–92. (in Russian)
- Minigalieva I.A., Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Guryich V.B., Bushueva T.V., et al. Combined subchronic toxicity of aluminum (III), titanium (IV) and silicon (IV) oxide nanoparticles and its alleviation with a complex of bioprotectors. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19(3): 837. <https://doi.org/10.3390/ijms19030837>
- Glushkova A.V., Radilov A.S., Dulov S.A. The manifestations of toxicity of nanoparticles (a review). *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2011; 90(2): 81–6. (in Russian)
- Dekkers S., Ma-Hock L., Lynch I., Russ M., Miller M.R., Schins R.P.F., et al. Differences in the toxicity of cerium dioxide nanomaterials after inhalation can be explained by lung deposition, animal species and nanoforms. *Inhal. Toxicol*. 2018; 30(7–8): 273–86. <https://doi.org/10.1080/08958378.2018.1516834>
- Gonokhova M.N., Boyko T.V., El'tsova A.A. The comparative cytomorphological characteristic of the spleen of rats at influence of pesticides. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; (6): 1056. (in Russian)
- Dosynbaeva G.N. Cytomorphological assessment of bronchoalveolar lavage cells, liver and stomach when exposed to cotton dust, containing an organophosphorus pesticides in the experiment. *International Scientific and Practical Conference World Science*. 2016; 3(5): 22–30. (in Russian)
- Macková N.O., Leníková S., Fedorocko P., Brezáni P., Fedorocková A. Effects of cadmium on haemopoiesis in irradiated and non-irradiated mice: 2. Relationship to the number of circulating blood cells and haemopoiesis. *Physiol. Res*. 1996; 45(2): 101–6.
- Lafuente A., González-Carracedol A., Esquifino A.I. Differential effects of cadmium on blood lymphocyte subsets. *Biometals*. 2004; 17(4): 451–6.
- Dieter R.R., Lee J.E., Hussain I., Piepenbrink M. Developmental immunotoxicology of lead (review). *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2004; 198(2): 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.08.020>
- Bazeluk L.T., Duzbaeva N.M., Khanturina G.R. Temirtau dust chronic exposure on experimental animals. *Eur. Res*. 2013; 6(1): 1618–23.
- Avtandilov G.G. *Medical Morphometry. Guide [Meditsinskaya morfometriya. Rukovodstvo]*. Moscow: Meditsina; 1990. (in Russian)
- Abramov M.G. *Clinical Cytology [Klinicheskaya citologiya]*. Moscow: Meditsina; 1974. (in Russian)
- Bibbo M., Wilbur D. *Comprehensive Cytopathology*. Elsevier Health Sciences; 2008.
- Tannenbaum M., Madden J.F., ed. *Diagnostic Atlas of Genitourinary Pathology*. Churchill Livingstone; 2006.
- Shabalova I.P. Capabilities and prospects of modern clinical cytology. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii*. 2014; 18(1–2): 64. (in Russian)

References

21. Thompson D.W. Canadian experience in cytology proficiency testing. *Acta Cytol.* 1989; 33(4): 484–6.
22. Nason R.W., Abdulrauf B.M., Stranc M.F. The anatomy of the accessory nerve and cervical lymph node biopsy. *Am. J. Surg.* 2000; 180(3): 241–3. [https://doi.org/10.1016/s0002-9610\(00\)00449-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9610(00)00449-9)
23. Hehn S.T., Grogan T.M., Miller T.P. Utility of fine-needle aspiration as a diagnostic technique in lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22(15): 3046–52. <https://doi.org/10.1200/jco.2004.02.104>
24. Dunphy C.H., Ramos R. Combining fine-needle aspiration and flow cytometric immunophenotyping in evaluation of nodal and extranodal sites for possible lymphoma: A retrospective review. *Diagn. Cytopathol.* 1997; 16(3): 200–6. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0339\(199703\)16:3%3C200::aid-dc2%3E3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0339(199703)16:3%3C200::aid-dc2%3E3.0.co;2-j)
25. Stani J. Cytologic diagnoses of reactive lymphadenopathy in fine needle aspiration biopsy specimens. *Acta Cytol.* 1987; 31(1): 8–13.
26. Wakely P.E. Jr. Fine needle aspiration cytopathology of malignant lymphoma. In: Stanley M.W., ed. *Clinics in Laboratory Medicine, Fine Needle Aspiration*. Philadelphia: Saunders; 1998: 541–59.
27. Milto I.V., Mikhaylov G.A., Ratkin A.V., Magaeva A.A. Influence nanoparticles on morphology of internal organs of the mouse at intravenous introduction of a solution nanopowder Fe₃O₄. *Byulleten sibirskoy meditsiny*. 2008; 7(1): 32–6. (in Russian)
28. Oyabu T., Myojo T., Lee B.W., Okada T., Izumi H., Yoshiura Y., et al. Biopersistence of NiO and TiO₂ nanoparticles following intratracheal instillation and inhalation. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(12): 2757. <https://doi.org/10.3390/ijms18122757>
29. Hejazy M., Koohi M., Bassiri Mohamad Pour A., Najafi D. Toxicity of manufactured copper nanoparticles – a review. *Nanomed. Res. J.* 2018; 3(1): 1–9. <https://doi.org/10.22034/nmrj.2018.01.001>
30. Lyamina S.V., Malyshev I.Yu. Macrophage polarization in the modern concept of immune response development. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; (10–5): 930–5. (in Russian)
31. Naito M., Hasegawa G., Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc. Res. Tech.* 1997; 39(4): 350–64. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0029\(19971115\)39:4%3C350::aid-jemt5%3E3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0029(19971115)39:4%3C350::aid-jemt5%3E3.0.co;2-l)
32. Zigmund E., Samia-Grinberg S., Pasmanik-Chor M., Brazowski E., Shiboleet O., Halpern Z., et al. Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident Kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *J. Immunol.* 2014; 193(1): 344–53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400574>
33. Elbakidze G.M. Mechanisms of protective influence of endotoxin-activated Kupffer cells on hepatocytes. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2012; 67(5): 48–54. <https://doi.org/10.15690/vramn.v67i5.274> (in Russian)
34. Burmester G.R., Pezzutto A., Ulrichs T., Aicher A. *Color Atlas of Immunology*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003.
35. Galić E., Ilić K., Hartl S., Tetyczka C., Kasemets K., Kurvet I., et al. Impact of surface functionalization on the toxicity and antimicrobial effects of selenium nanoparticles considering different routes of entry. *Food Chem. Toxicol.* 2020; 144: 111621. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111621>
36. Radauer-Preiml I., Andosch A., Hawranek T., Luetz-Meindl U., Wiederstein M., Horejs-Hoeck J. Nanoparticle-allergen interactions mediate human allergic responses: protein corona characterization and cellular responses. *Part. Fibre Toxicol.* 2016; 13: 3. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0113-0>