“ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ”
“EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY”
Науково-практичний журнал/Scientific-practical journal

Наукові статті / Research article
ECPB 2019, 1(85): 52–57. <https://doi.org/>

УДК 616.155.348:615.27

Застосування моделі «повітряної кишені» для оцінки здатності імунних клітин локалізувати чужорідні нано- та мікрочастинки

С.Я. ПАРИЖАК, Т.І. ДУМИЧ, Г.І. БІЛА, Р.О. БІЛИЙ

*Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,
Львів, Україна*

E-mail: r.bilyy@gmail.com

Широке використання мікро- та наночастинок у медицині та біотехнології вимагає розробки нових підходів до оцінки взаємодії цих частинок з тканинами організму. Макрофагальна система організму здатна поглинати деякі кристали та наночастинки [1] з їх наступним окисненням чи перетравленням/розчиненням у кислому середовищі лізосом. Проте у випадку інертних, гідрофобних чи надто великих частинок, частинок з гострими краями і т. д. такий механізм неефективний і єдиним шляхом забезпечення їх безпечного перебування в організмі є ізоляція, чи секвестрування? наночастинок, зокрема, шляхом оточення позаклітинними нейтрофільними пастками [2]. Відстеження частки введених у тканини частинок малого розміру є непростим завданням, їх детектування вимагає приєднання складних (радіоізотопних) чи великих у молекулярних масштабах (флуоресцентних) міток, які не лише змінюють структуру наночастинок, але й ускладнюють виявлення. Частково проблему взаємодії наноконструктивів із тканинами організму можна вирішити за допомогою моделі «повітряної кишені». «Повітряна кишеня» (англ. air pouch) – це експериментально індукована порожнина, заповнена повітрям, що швидко інфільтрується клітинами сполучної тканини, даючи змогу вивчати взаємодію останніх із уведеним вмістом.

Перше використання моделі «повітряної кишені» для вивчення інфекції та запалення у щурів описане понад півстоліття тому [3]. Базуючись на гістопатологічних дослідженнях, показано, що формування кровоносних судин і механічного бар'єру, є ідеальним на 6-й день, а інфільтрація імунними клітинами оптимальна через 24 год після введення досліджуваного продукту [4–6]. Моделі «повітряних кишень» використовували для дослідження механізмів дії препаратів, фармакокінетики [7], індукції або інгібування ферментів [8,9], місцевої доставки лікарських засобів [10], ангиогенезу [11] та міграції клітин [9], і поступово ця модель стала стандартним тестом, який дає змогу зрозуміти участь різних факторів у розвитку запальних процесів.

Гістологічно «порожнина повітряної» кишені вистелена напівпрозорою мембраною, що складається із колагенових волокон з видовженими фібробластними клітинами. Цей шар називають «внутрішнім вистеленням повітряної порожнини». Між фібробластними клітинами знаходяться мононуклеарні фагоцити і невелика кількість поліморфноядерних клітин. Іноді у цьому шарі виявляються кілька розкиданих видовжених мастоцитів. Між внутрішньою вистилкою і дермою шкіри верхня стінка містить тонкий шар

скелетних м'язів. Мастоцити рідко трапляються у цьому шарі. Мастоцити неправильної форми знайдені поблизу щільних колагенових волокон між волосяними фолікулами і концентруються ближче до епідермісу [12].

Раніше ми показали, що наночастинки певних розмірів призводять до ушкодження мембрани нейтрофілів, що запускає механізм утворення нейтрофільних позаклітинних пасток (НПП) і підсилює відповідь імунної системи на одночасно введені антигени [2,13]. Очевидно, що крім утворення НПП у відповідь на дію бактерій, грибів, деяких вірусів, у нейтрофілів існує механізм активації утворення НПП у відповідь на неспецифічні ушкодження плазматичної мембрани нано- і мікрочастинками [14,15]. НПП ефективно ізолюють сторонні тіла та оточують ділянки запалення [16]. Механізм дії НПП виявляється через захоплення чужорідних часток деконденсованою ДНК і гістонами, декорованими компонентами нейтрофільних гранул [17], останні виявляють токсичну дію (через утворення активних форм кисню та інших сполук). Нещодавно було продемонстровано, що утворення НПП відіграє важливу роль у ад'ювантній дії введених солей алюмінію (також відомих в англomовній літературі як Alum). Це впливає на нейтрофіли, які сприймають локальне ушкодження із стимуляцією сенсорів ДНК та провокують місцеву запальну реакцію [18]. Одним з вагомих джерел інертних нано- та мікрочастинок, що вводяться в організм людини, є інертні носії, які використовуються в ролі ад'ювантів вакцин. У низці випробувань було помічено, що ад'ювантна активність маленьких видовжених часточок (нанострижнів чи нанопаличок) сполук алюмінію є сильнішою порівняно з вихідними порошкоподібними формами [19–21], хоча причина підвищеної ефективності залишалася значною мірою нез'ясованою, тож введення мікро- та наночастинок в організм уже довгий час використовується у медичній практиці. Утворення НПП також є результатом відповіді на солі моноурату натрію при подагрі [22], та інших наночастинок, як-от оксалат кальцію, фосфат кальцію, холестерин, азбест та кремній [23].

Модель «повітряної кишені» знайшла ефективне використання у дослідженнях взаємодії з організмом тварин природних нанокomпозитів – кристалів моноурату натрію [24], нанодіамантів та полістирольних наночастинок [13], наночастинок алотропних модифікацій вуглецю [25]. Проте порівняння взаємодії наночастинок різних класів сполук не здійснювалось.

Метою цієї роботи було оцінити вплив мікро- та наночастинок на утворення нейтрофільних позаклітинних пасток у моделі «повітряної кишені» мишей. У цьому дослідженні ми використали комерційно доступний алюміній гідроксид ($\text{Al}(\text{OH})_3$) та синтезовані й надані нам для подальшої роботи нановолокна оксиду алюмінію ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ НВ), а також відносно інертний графен оксид. Завданням роботи було описати модель досліджень, яка б забезпечувала можливість стандартизованої оцінки взаємодій наночастинок, та їх секвестрування нейтрофільними позаклітинними пастками.

Матеріали й методи дослідження. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до рішення біоетичної комісії ЛНМУ ім. Данила Галицького (протокол 20180226/2).

Експериментальних тварин (мишей лінії Balb/C) було поділено на групи (у кожній $n = 5$). «Повітряну кишеню» формували шляхом ін'єкції 5–7 мл стерильного повітря підшкірно у ділянці спини мишей для утворення «кишені», в яку згодом інфільтруються імунні клітини. Через два дні у сформовану «кишеню» додатково вводили 2–5 мл стерильного повітря. Ще через два дні 4 мг досліджуваної сполуки у фізіологічному розчині або лише фізіологічний розчин (негативний контроль) вводили у «повітряну кишеню» миші. Наступного дня тварин виводили з експерименту, досліджували клітинний вміст «кишені» та аналізували забрану шкіру. Для визначення клітинного вмісту «повітряної кишені», в останню вводили 2 мл фізіологічного розчину, і через одну хвилину відбирали його. Для осадження клітин отриманий змив центрифугували 5 хв, 1200 об./хв та готували мазки для

подальшого гістологічного дослідження. Для візуалізації клітин, останні забарвлювали розчином гематоксилін-еозину та аналізували за допомогою світлової мікроскопії.

Тканину «повітряної кишені» забирали та відразу здійснювали мікрофотографування. Після цього отримані зразки витримували на повітрі до повного висихання та повторно аналізували [13].

Результати дослідження та їх обговорення. Оскільки нановолокна оксиду алюмінію ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ НВ) викликали підвищену гуморальну імунну відповідь, ми зацікавились наслідками їх введення в організм. Це дослідження було проведено з використанням описаної моделі «повітряної кишені» [12] у мишей. Схематично експеримент з використанням моделі «повітряної кишені» представлено на рис. 1.

Рис. 1. Схематичне зображення використання моделі «повітряної кишені» для визначення здатності нейтрофілів секвеструвати/локалізувати введений матеріал. «Повітряна кишеня» формується шляхом підшкірного введення стерильного повітря. Імунні клітини інфільтрують утворену структуру. На п'ятий день у сформовану «кишеню» інокулюють досліджувані частинки

Аналіз клітинного вмісту «повітряної кишені» (рис. 2) показав, що на 6-й день від початку експерименту лейкоцити інфільтрують «повітряну кишеню». Крім нейтрофільних гранулоцитів було виявлено значну кількість еозинофілів, моноцитів та мастоцитів, які також беруть участь у розвитку запального процесу. Нейтрофіли у «повітряній кишені» зазнавали активації та утворювали нейтрофільні позаклітинні пастки. Етапи формування останніх представлено на рис. 2, б-г.

Як з $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ НВ, так і з $\text{Al}(\text{OH})_3$ ми спостерігали захоплення введених сполук алюмінію та формування агрегованих НПП (рис. 3, в, г) навколо них. Проте капілярні пошкодження та набряки були менш помітні при введенні $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ НВ (рис. 3, в) порівняно із $\text{Al}(\text{OH})_3$ (рис. 3, г).

У випадку ін'єкції графен оксиду ми спостерігали заповнення останнім «повітряної кишені» та появу незначної еритеми (рис. 3, б). Проте формування НПП не відбувалось. Як негативний контроль використовували фізіологічний розчин (рис. 3 а).

Рис. 2. Клітинний вміст «повітряної кишені». Підшкірна ін'єкція повітря призводить до розвитку запалення та міграції лейкоцитів у сформовану «кишеню» (а). Нейтрофільні гранулоцити активуються та формують нейтрофільні позаклітинні пастки (НПП) (б-г). Мо – моноцит, Е – еозинофіл, Н – нейтрофіл, М – мастоцит

Рис. 3. Утворення нейтрофільних позаклітинних пасток у «повітряній кишені» після ін'єкції: а – фізіологічного розчину (негативний контроль); б – розчину графен оксиду; в – $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ НВ; г – $\text{Al}(\text{OH})_3$ у фізіологічному розчині

Модель «повітряної кишені» може використовуватися для ефективної і швидкої оцінки здатності імунних клітин, зокрема нейтрофілів, секвеструвати окремі частинки, як це показано в цій роботі для нанокompatитів алюмінію, але не для частинок графен оксиду.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

ПОСИЛАННЯ

1. Nakayama M. Macrophage Recognition of Crystals and Nanoparticles. *Front Immunol.* 2018;9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00103/full>
2. Biermann MHC, Podolska MJ, Knopf J, Reinwald C, Weidner D, Maueröder C, et al. Oxidative burst-dependent NETosis is implicated in the resolution of necrosis-associated sterile inflammation. *Front Immunol.* 2016;7(DEC).
3. Okudaira M, Schwarz J. Histoplasma capsulatum infection in rat air pouch. *Arch Pathol.* 1962;74:239–43.
4. Sedgwick AD, Sin YM, Edwards JCW, Willoughby DA. Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. *J Pathol.* 1983;141(4):483–95.
5. Edwards JCW, Sedgwick AD, Willoughby DA. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: An in vivo tissue culture system. *J Pathol.* 1981;134(2):147–56.
6. Sin YM, Sedgwick AD, Moore A, Willoughby DA. Studies on the clearance of calcium pyrophosphate crystals from facsimile synovium. *Ann Rheum Dis.* 1984;43(3):487–92.
7. Dalhoff A, Frank G, Luckhaus G. The granuloma pouch: an in vivo model for pharmacokinetic and chemotherapeutic investigations. I. Biochemical and histological characterization. *Infection.* 10(6):354–60.
8. Hashida R, Chiba K, Yamatsu I, Katayama K. Collagenase production in the exudate of a novel adjuvant-induced air pouch inflammation model in rats. *Agents Actions.* 1991;34(1–2):242–3.
9. Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J Clin Invest.* 1993;92(6):2675–82.
10. Martin SW, Stevens AJ, Brennan BS, Reis ML, Gifford LA, Rowland M et al. Regional drug delivery I: permeability characteristics of the rat 6-day-old air pouch model of inflammation. *Pharm Res.* 1995;12(12):1980–6.
11. Eteraf-Oskouei T, Allahyari S, Akbarzadeh-Atashkhosrow A, Delazar A, Pashaii M, Gan SH et al. Methanolic Extract of Ficus carica Linn. Leaves Exerts Antiangiogenesis Effects Based on the Rat Air Pouch Model of Inflammation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:760405.
12. Sin YM, Sedgwick AD, Chea EP, Willoughby DA. Mast cells in newly formed lining tissue during acute inflammation: A six day air pouch model in the mouse. *Ann Rheum Dis.* 1986;45(10):873–7.
13. Muñoz LE, Bilyy R, Biermann MHC, Kienhöfer D, Maueröder C, Hahn J et al. Nanoparticles size-dependently initiate self-limiting NETosis-driven inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 [cited 2017 Nov 5];113(40):E5856–65. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1602230113>.
14. Dumych T, Paryzhak S, Peshkova S, Bila G, Lutsyk O, Bilyy P et al. How Can the Death of Cells Be Useful For a Human Body? *Exp Clin Physiol Biochem.* 2018;2018(2):77–85. Available from: <http://ecpb.org.ua/archive/82/2/77>
15. Paryzhak S, Dumych T, Bilyy R. Pathways of neutrophil activation by natural hydrophobic nanocrystals. *Exp Clin Physiol Biochem.* 2018;2018(1):68–73.
16. Bilyy R, Fedorov V, Vovk V, Leppkes M, Dumych T, Chopyak V et al. Neutrophil Extracellular Traps Form a Barrier between Necrotic and Viable Areas in Acute Abdominal Inflammation. *Front Immunol.* 2016;7(OCT). Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00424/full>.
17. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 2009;30(11):513–21.
18. Stephen J, Scales HE, Benson RA, Erben D, Garside P, Brewer JM. Neutrophil swarming and extracellular trap formation play a significant role in Alum adjuvant activity. *NPJ vaccines.* 2017;2(1):1.
19. Sun B, Pokhrel S, Dunphy DR, Zhang H, Ji Z, Wang X et al. Reduction of Acute Inflammatory Effects of Fumed Silica Nanoparticles in the Lung by Adjusting Silanol Display through Calcination and Metal Doping. *ACS Nano.* 2015;9(9):9357–72.
20. Li X, Hufnagel S, Xu H, Valdes SA, Thakkar SG, Cui Z et al. Aluminum (Oxy)Hydroxide Nanosticks Synthesized in Bicontinuous Reverse Microemulsion Have Potent Vaccine Adjuvant Activity. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9(27):22893–901.
21. Sun B, Ji Z, Liao Y-P, Wang M, Wang X, Dong J et al. Engineering an Effective Immune Adjuvant by Designed Control of Shape and Crystallinity of Aluminum Oxyhydroxide Nanoparticles. *ACS Nano.* 2013;7(12):10834–49.
22. Schauer C, Janko C, Muñoz LE, Zhao Y, Kienhöfer D, Frey B et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med.* 2014;20(5):511–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24784231>.
23. Desai J, Foresto-Neto O, Honarpisheh M, Steiger S, Nakazawa D, Popper B et al. Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin. *Sci Rep.* 2017;7(1):15003. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-15106-0>.

24. Schauer C, Janko C, Munoz LELE, Zhao YY, Kienhöfer D, Frey B et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med.* 2014;20(5):511–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.3547>.

25. Paryzhak S, Dumych T, Peshkova S, Bila E, Lutsyk A, Barras A et al. Interaction of 4 allotropic modifications of carbon nanoparticles with living tissues. *Ukr Biochem J.* 2019;91:accepted.

Подяка: робота виконана за підтримки проекту Horizon-2020-MSCA-RISE-2015, PANG-690836 та проекту МОЗ України «Використання поза-клітинних нейтрофільних пасток для модулювання запальних процесів».

Стаття надійшла до редколегії 05.03.2019 р.

RESEARCH ARTICLES

Application of air Pouch Model for Evaluation the Ability of Immune Cells to Sequester Foreign Nano- and Microparticles

S.YA. PARYZHAK, T.I. DUMYCH, G.I. BILA, R.O. BILYY

Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

E-mail: r.bilyy@gmail.com

Wide application of nano- and microparticles requires new effective approaches for evaluation of interaction of micro- and nanoparticles with body tissues. Human macrophage system has developed some mechanisms for recognition, engulfment and elimination by oxidation/digestion of crystals and nanoparticles. However, this approach does not work in the case of hydrophobic, inert or sharp edged particles, usually resulting in some damaging of engulfing macrophages and stimulating recruitment of neutrophils. The latter was shown to form neutrophil extracellular traps (NETs) being able to surround, sequester and eventually isolate nanoparticles, preventing their further contact with the body. Tracking of nano- and microparticles is often challenging, because it requires radioactive labeling or the use of other complicated methods of detection.

Air pouch model is an artificial cavity, usually induced on the back of experimental mice by injection of sterile air. In some time it becomes widely populated with different immune cells and was effectively used for many years with the aim to study different biological processes like pharmacokinetics, angiogenesis or cell migration. We have recently demonstrated the use of the air pouch model for analysis the sequestration of nanodiamonds, polystyrene nanoparticles or carbon nanoparticles.

In the current work we described the methodological part related to the use of the air pouch model for evaluation of immune cells' ability to sequester injected foreign particles. As examples we used aluminium oxide nanowires, aluminium hydroxide and graphene nanoparticles. The formers are often injected to the body during vaccination process as adjuvants, and were recently shown to be entrapped by NETs at the place of injection, while the latter is a very resistant example of carbon pollutants, which are becoming a serious danger during forest fires, caused by climate changes and other factors.

On the basis of histopathological studies, the formation of air pouch was found to be ideal on the 6th day based on mechanical barrier and blood vessels, and the infiltration of immune cells was optimal 24 hours after the injection of the tested sample. Thus, the analysis of nanoparticle interaction can be done within 7 days. Significant numbers of eosinophils, monocytes and mastocytes, involved in the development of the inflammatory process, were detected inside the air pouch. Neutrophils in the air pouch were forming NETs. We observed entrapment of both $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ NWs and $\text{Al}(\text{OH})_3$ compounds and the formation of aggregated NETs around them. However, micro-capillary damage and edema were significantly less visible for $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ NWs than for commercial alum. At the same time the inert carbon nanomaterial graphene oxide was not sequestered or phagocytosed by any of the cell types infiltrating the air pouch cavity and 24 hours post-injection was still filling all space of air pouch cavity.

The proposed approach can be effectively utilized to study interactions of immune cells with other particulate nanomatter.

Key words: air pouch model, adjuvants, micro- and nanoparticles, neutrophil extracellular traps.