

Сахаутдинова Р.Р., Сутункова М.П., Минигалиева И.А., Бушуева Т.В.

## Применение цитологического метода исследования мазков у экспериментальных животных для оценки токсического действия металлосодержащих наночастиц

ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий» Роспотребнадзора, 620014, Екатеринбург

**Введение.** Цитологический метод мазков-отпечатков достаточно известен и широко применяется в клинической практике, не менее интересен он и в качестве экспресс-метода оценки цитоморфологических параметров влияния металлосодержащих наночастиц на ткани экспериментальных животных.

**Материал и методы.** Исследованы 144 цитологических препарата мазков-отпечатков органов (печень, почки, лёгкие, трахеобронхиальные и брыжеечные лимфатические узлы) крыс (52 особи), массой тела 280–300 г, в возрасте 3,5 мес после субхронического внутрибрюшинного эксперимента с наночастицами оксидов титана, алюминия и кремния в разных дозах и 5-кратного ингаляционного воздействия никельсодержащих наночастиц в концентрации 1 мг/м<sup>3</sup>. Окраска по Лейшману. Цитологические признаки изучены в световом бинокулярном микроскопе Carl Zeiss Primo Star с системой визуализации видеокамерой USCMOS при увеличении × 100 и 1000. При морфометрии лёгких, печени и почек подсчёт осуществлён на 200 клеток с каждого препарата, лимфатических узлов на 100 клеток. Различия между среднегрупповыми количественными результатами обработаны с помощью критериев Стьюдента с использованием компьютерной программы Excel. Различия между средними величинами считались статистически значимыми, если вероятность возникновения случайного различия не превышала 5% ( $p < 0,05$ ).

**Результаты.** Приведены основные результаты, полученные при изучении цитологических препаратов мазков-отпечатков некоторых органов крыс после воздействия металлосодержащих наночастиц. Выделены основные типы формирования клеточных реакций. Показаны дегенеративно-дистрофические изменения в препаратах печени, почек, лёгких при разных путях введения и концентрациях наночастиц. Выявлены воспалительные реакции гиперергического типа при воздействии наночастиц оксида никеля. Наряду с этим отмечено формирование местного клеточного иммунитета за счёт процентного увеличения уровня макрофагов в мазках отпечатках некоторых органов.

**Заключение.** Применение цитологического метода мазков-отпечатков совместно с гистологическим исследованием тканевых препаратов расширяет возможности для более полного морфологического и морфометрического анализа при исследовании токсических эффектов металлосодержащих наночастиц.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** цитоморфология; крысы; печень; почки; лёгкие; лимфатический узел; наночастицы.

**Для цитирования:** Сахаутдинова Р.Р., Сутункова М.П., Минигалиева И.А., Бушуева Т.В. Применение цитологического метода исследования мазков у экспериментальных животных для оценки токсического действия металлосодержащих наночастиц. *Гигиена и санитария*. 2020; 99 (1): 120-124. DOI: <http://dx.doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-1-120-124>

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

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Поступила: 09.10.19

Принята к печати: 12.12.19

Опубликована: 27.02.2020

Sakhautdinova R.R., Sutunkova M.P., Minigalieva I.A., Bushueva T.V.

## A cytological study of imprint smears (touch preparation cytology) to evaluate the toxicity of metal-containing nanoparticles in experimental animals

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

**Introduction.** Touch preparation cytology is a well-known technique widely used in clinical practice. It can be also applied for an express assessment of cyto-morphological effects of metal-containing nanoparticles in experimental animals.

**Material and methods.** We've studied 144 imprint smears (of the liver, kidneys, lungs, tracheobronchial and mesenteric lymph nodes) taken from 52 rats, weighed 280-300 g, aged 3.5 months. This was done following a subchronic intraperitoneal administration of TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and SiO<sub>2</sub> nanoparticles, in a range of doses, and a subacute (5-times) inhalational exposure to 1 mg/m<sup>3</sup> NiO NPs. Leishman stain was used. Cytological markers were studied at x100/x1000 magnification, using a Carl Zeiss Primo Star microscope, with a USCMOS camera for visualization. The count was done for every 200 cells of lung, liver and kidney specimens and for every 100 cells of lymph node tissue. The differences between the group means (in case of quantitative results) were analyzed using a Student's t-test. The differences between the group means were considered statistically significant if the probability of those differences being accidental didn't exceed 5% ( $p < 0,05$ ).

**Results.** We report the principal results obtained in a cytological study of imprint smears (touch preparations) of rat organs following the exposure to metal-containing nanoparticles. The main types of cellular responses were determined. Degenerative and dystrophic changes were observed in touch preparations of the liver, kidneys, and lungs following administration of nanoparticles in a range of doses and by various routes of exposure. Hyperergic inflammatory responses were seen upon the exposure to nickel oxide nanoparticles. A local cellular immune response was observed as an increase of macrophage percentage in imprint smears of some organs.

**Conclusion.** The use of touch preparation cytology together with histological examination of tissue specimens expand opportunities for a more relevant morphological and quantitative analysis when studying the toxic effects of metal-containing nanoparticles.

*Key words:* cytomorphology; liver; kidneys; lungs; lymph nodes; nanoparticles.

**For citation:** Sakhautdinova R.R., Sutunkova M.P., Minigalieva I.A., Bushueva T.V. A cytological study of imprint smears (touch preparation cytology) to evaluate the toxicity of metal-containing nanoparticles in experimental animals. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99 (1): 120-124. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-1-120-124>

**For correspondence:** Tatyana V. Bushueva, MD, Ph.D., 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>; Sutunkova M.P. <https://orcid.org/0000-0002-1743-7642>  
Minigalieva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-0097-7845>; Bushueva T.V. <https://orcid.org/0000-0002-5872-2001>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Contribution:** The design of the study - Bushueva T.V. Data collection, data processing - Sakhautdinova R.R. Statistics - Minigalieva I.A. Text writing - Sakhautdinova R.R., Bushueva T.V. Text editing - Sutunkova M.P. A final version confirmation process and consistency ensuring process done - Sakhautdinova R.R., Sutunkova M.P., Minigalieva I.A., Bushueva T.V.

Received: October 09, 2019

Accepted: December 12, 2019

Published: February 27, 2020

## Введение

Получение и применение наноматериалов представляет одно из передовых направлений инновационных разработок и научных исследований. Одновременно с расширением сферы применения актуализируются вопросы изучения биобезопасности материалов [1–3]. Исследователи пользуются разнообразными диагностическими тестами для изучения эффектов их токсического действия. Так, в литературе представлены результаты цитологического анализа бронхоальвеолярного лаважа и полуконтактной атомно-силовой микроскопии топографии поверхности клеток при интратрахеальном введении оксида никеля и оксида марганца [4]. В медицинской литературе мы встретили несколько аргументов в пользу применения цитологического исследования для изучения токсических эффектов металлов. Оценка цитоморфологической картины отпечатка среза органа или ткани на предметном стекле применялась группой исследователей в качестве экспресс-метода изучения иммуно-токсического действия химических соединений в эксперименте *in vivo* и оценки отдалённых эффектов лекарственных препаратов на живой организм [5]. В научной литературе встречается описание образцов, полученных в виде мазков-отпечатков для изучения экспериментальных пневмокозиозов, действия малых доз ксенобиотиков на экспериментальных животных и выявления гипертрофированных форм реснитчатых и бокаловидных клеток слизистой верхних дыхательных путей у больных аллергией [6]. Изучение клеток на отпечатках органов имеет особое значение, так как клетки, прикрепленные к стеклу, локализируются в один слой, который позволяет оценить и описать качественные и количественные характеристики морфологической структуры клеточных элементов, микроокружение отдельных объектов, и при этом окраска и фиксация препарата не изменяют клеточную морфологию [5, 7]. Для объективизации цитологического исследования используют оценку цитоморфологических показателей.

Метод отпечатков имеет следующие преимущества: не требует дополнительного оборудования и времени (как подготовка гистологических препаратов), возможность применения многократных исследований для оценки морфологических изменений, требуется небольшое количество адекватного материала для изучения, а также является методом выбора при невозможности применения гистологического исследования.

Мазки-отпечатки для цитологического анализа в клинической практике получают во время операционного вмешательства и биопсии. Этот метод может быть использован как самостоятельно, так и параллельно с другими диагностическими тестами. В этих случаях помимо пункций проводят получение отпечатков с удалённых или обнажённых органов с помощью прикосновения стекла предметного к исследуемой ткани. Стоит отметить, что при применении метода клетки в меньшей степени травмируются и располагаются пластами, что даёт возможность описания соотношения клеток между собой. Данный вид исследования позволяет качественно и количественно охарактеризовать морфологическую структуру клеточных элементов в препарате [8–11].

Среди существующих объективных методов оценки токсических эффектов металлосодержащих наночастиц (Me-НЧ) гистологическое исследование препаратов занимает одно из первых мест. Точная верификация патологического процесса в тканях определённой принадлежности целиком основывается на данных морфологического исследования. Наряду с гистологическими методами при оценке отдельных вопросов клеточной патологии в эксперименте и клинике можно применять простой недорогостоящий и информативный метод цитологического исследования мазков-отпечатков, который играет важную роль в современной медицине и отличается от гистологического тем, что выполняется на клеточном уровне, а не на тканевом [12, 13]. Основными объектами цитологического исследования могут быть не только единичные клетки, но и их комплексы. Препараты для цитологического исследования могут быть подготовлены разными методами, что особенно актуально при изучении патогенетических механизмов воздействия вредных факторов в эксперименте [14].

Таким образом, по данным литературы, метод мазков-отпечатков достаточно известен и широко применяется в клинической практике, не менее интересен он и в качестве экспресс-метода оценки цитоморфологических параметров влияния металлосодержащих наночастиц на ткани экспериментальных животных. Стоит отметить, что при изучении эффектов наночастиц данный метод ранее не описывался, и данная техника впервые была применена нашим коллективом в исследовании токсичности Me-НЧ. На наш взгляд, интерес представляет сравнительный анализ цитологических характеристик клеток в препаратах мазков-отпечатков органов, полученных в ходе эксперимента по изучению токсичности некоторых металлосодержащих наночастиц при разных способах их введения лабораторным животным.

Таблица 1

**Показатели гиперергического воспаления в тканевых мазках-отпечатках через сутки после 5-кратного ингаляционного воздействия наночастиц NiO и после изолированного субхронического воздействия Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-НЧ, TiO<sub>2</sub>-НЧ, SiO<sub>2</sub>-НЧ, в процентах от общего количества клеток ( $\bar{X}_{cp} \pm S_x$ )**

Показатель	НЧ NiO		Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -НЧ		TiO <sub>2</sub> -НЧ		SiO <sub>2</sub> -НЧ	
	лёгкие	лимфатические узлы	печень	почки	печень	почки	печень	почки
Нейтрофилы	10,29 ± 0,87	0,71 ± 0,29	10,17 ± 1,76*	4,33 ± 1,18	8,50 ± 1,63*	5,00 ± 1,26	11,57 ± 0,97*	5,67 ± 1,33
Эозинофилы	10,00 ± 1,31*	5,71 ± 1,43*	3,73 ± 1,10	2,33 ± 0,87	5,10 ± 1,28*	5,00 ± 1,26*	7,29 ± 0,68*	2,00 ± 0,81
Контроль нейтрофилы	8,00 ± 0,81	1,40 ± 0,24	3,72 ± 1,10	5,00 ± 1,26	3,72 ± 1,10	5,00 ± 1,26	3,72 ± 1,10	5,00 ± 1,26
Контроль эозинофилы	1,75 ± 0,49	0,60 ± 0,40	1,35 ± 0,67	0,67 ± 0,47	1,35 ± 0,67	0,67 ± 0,47	1,35 ± 0,67	0,67 ± 0,47

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: \* – статистически значимое различие с группой «контроль» (при  $p \leq 0,05$  по  $t$ -критерию Стьюдента).

## Материал и методы

В исследование брались органы аутобредных крыс-самцов (52 особи), массой тела 280–300 г, в возрасте 3,5 мес после субхронического внутрибрюшинного эксперимента с наночастицами оксидов титана, алюминия и кремния в разных дозах и 5-кратного ингаляционного воздействия никельсодержащих наночастиц в концентрации 1 мг/м<sup>3</sup>.

После умерщвления крыс декапитацией у животных из каждой группы извлекали органы. Для приготовления препаратов использовали новые стёкла, стандартного размера, обезжиренные и сухие. С печени, почек, внутрибрюшинных и трахеобронхиальных лимфатических узлов, лёгких делали мазки-отпечатки, которые высушивали при комнатной температуре. Подготовленные препараты опускали в фиксатор-краситель Лейшмана на 3 мин с последующим промыванием водопроводной водой. После погружали в подготовленный заранее краситель (40 мл 0,1% красителя азури II, 30 мл 0,1% водорастворимого эозина, 70 мл дистиллированной воды). Время окрашивания 30 мин. Для предотвращения повторного просмотра ранее исследованных клеток движение осуществляли слева направо, снизу вверх. Для анализа выбирали отдельно лежащие неповреждённые клетки, при этом наложенные друг на друга клетки не оценивали. Клеточный состав и цитологические признаки оценивали в световом бинокулярном микроскопе Carl Zeiss Primo Star с системой визуализации видеокамерой USCMOS при увеличении ×100 и 1000 в соответствии с цитологическими критериями. При микроскопировании лёгких, печени и почек подсчитывали 200 клеток с каждого мазка. Цитогрaмму лимфатических узлов считали на 100 клеток [4]. Количество исследований в двух экспериментах – 144. Различия между среднегрупповыми количественными результатами обрабатывали с помощью критериев Стьюдента с использованием компьютерной программы Excel. Различия между средними величинами считались статистически значимыми, если вероятность возникновения случайного различия не превышала 5% ( $p < 0,05$ ).

## Результаты

В данной работе мы впервые провели оценку повреждения клеток различных органов крыс при острых и субхронических нанointоксикациях не только с применением гистологических исследований препаратов, но и использовали технику цитологического анализа тканевых отпечатков [15]. Несмотря на широкое экспериментальное применение наночастиц, на сегодняшний день недостаточно внимания уделено вопросам кинетики и элиминации наночастиц в живом организме, а также возможным токсическим эффектам, связанным с введением наночастиц оксидов металлов [16–18].

Известно, что при патологических процессах в мазках-отпечатках некоторых органов количество дегенерированных клеток заметно увеличивается, цитоплазма клеток окрашивается неравномерно, что чаще всего связано с дистрофическими процессами, также наблюдается увеличение элементов воспаления, что свидетельствует о развитии воспалительной реакции [11].

Данные изменения мы наблюдали при описании цитогрaмм печени, почек и лёгких в опытных группах.

При описании цитогрaмм в опытных группах после воздействия Me-HЧ в мазках-отпечатках как при острых (NiO), так и субхронических (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-HЧ, TiO<sub>2</sub>-HЧ, SiO<sub>2</sub>-HЧ) нанointоксикациях мы выявили некоторые общие цитологические изменения. В препаратах печени на фоне воспалительно-клеточной инфильтрации (нейтрофилы, лимфоциты) разной степени активности, тяжёлой детрита наблюдали группы гепатоцитов с признаками белковой дистрофии и дегенеративно-дистрофическими изменениями, а также одиночные группы гепатоцитов с признаками некроза (кариолизис, кариопикноз, кариорексис). Сходные цитологические изменения были найдены при описании мазков отпечатков почек [19–23]. В препаратах лёгких наблюдали на фоне большого количества альвеолярных макрофагов и небольшого количества сегментоядерных нейтрофилов группы клеток эпителия бронхов также с дегенеративно-дистрофическими изменениями (рис. 1, 2, см. на 3-й стр. обложки) [24–26]. После воздействия Me-HЧ на лимфатические узлы в мазках-отпечатках отмечали признаки реактивной гиперплазии.

Анализ результатов цитологического исследования тканевых отпечатков позволяет выделить несколько типов клеточных реакций, которые развиваются в органах лабораторных животных при воздействии металлосодержащих наночастиц. Первый тип вызван развитием воспаления с преобладанием гиперергического ответа и характеризуется достоверным повышением, при сравнении с контролем, эозинофилов в лёгких и лимфатических узлах после 5-кратного ингаляционного воздействия никельсодержащих наночастиц в концентрации 1 мг/м<sup>3</sup>, а также в печени и почках при субхроническом воздействии наночастиц оксида кремния и наночастиц оксида титана (табл. 1).

Второй тип реакций, который возможно визуализировать в мазках-отпечатках, характеризует развитие дегенеративно-дистрофических процессов. Эти изменения были выявлены в мазках-отпечатках печени и почках как при острой, так и субхронической интоксикации разной степени выраженности (табл. 2). Сходные изменения клеток эпителия бронхов были получены и в мазках-отпечатках лёгких при ингаляционном введении NiO-HЧ.

На наш взгляд, очень важным является возможность обнаружения в мазках-отпечатках клеток Купфера (рис. 3, см. на 3-й стр. обложки), которые регулируют функцию гепатоцитов, продуцируя целый комплекс биологически активных веществ и контакт с микроокружением [23, 27, 28]. Так, в нашем эксперименте были достоверно повышены по отношению к контролю клетки Купфера при субхроническом воздействии Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-HЧ (6,10 ± 1,39 в опыте против 2,03 ± 0,82 в контроле) и 5-дневном введении NiO-HЧ (5,43 ± 0,48 в опыте против 3,00 ± 0,68 в контроле). Особо стоит отметить достоверное увеличение альвеолярных макрофагов при анализе мазков-отпечатков лёгких при интоксикации NiO-HЧ (6,86 ± 1,30\*) по сравнению с группой контроля (6,25 ± 0,89), что дополнительно свидетельствует о формировании местного иммунного ответа. Этот результат согласуется с увеличением этих клеток в жидкости бронхоальвеолярного лаважа в этом же эксперименте [29].

Таблица 2

Некоторые цитологические характеристики тканевых отпечатков печени в % к общему числу подсчитанных клеток в препарате после субхронического воздействия  $Al_2O_3$ -НЧ,  $TiO_2$ -НЧ,  $SiO_2$ -НЧ изолированно ( $X_{cp} \pm S_x$ ) и после 5-кратного ингаляционного воздействия наночастиц NiO в процентах от общего количества клеток ( $\bar{X}_{cp} \pm S_x$ )

Показатель	$Al_2O_3$ -НЧ		$TiO_2$ -НЧ		$SiO_2$ -НЧ		NiO-НЧ	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Дегенеративно изменённые гепатоциты	6,42 ± 1,42	9,49 ± 1,71	6,42 ± 1,42	8,16 ± 1,60	6,2 ± 1,42	5,78 ± 1,36	8,75 ± 0,84	21,86 ± 0,99*
Купферовские макрофаги	2,03 ± 0,82	6,10 ± 1,39*	2,03 ± 0,82	2,38 ± 0,89	2,03 ± 0,82	3,74 ± 1,11	3,00 ± 0,68	5,43 ± 0,48*
Дегенеративные клетки проксимальных канальцев, почки	10,00 ± 1,73	13,00 ± 1,94	10,00 ± 1,30	14,00 ± 2,00	10,00 ± 1,73	14,67 ± 2,04	11,33 ± 0,58	22,71 ± 1,64*
Дегенеративные клетки дистальных канальцев, почки	7,67 ± 1,54	8,33 ± 1,60	7,67 ± 1,54	8,33 ± 1,60	7,67 ± 1,54	6,00 ± 1,37	5,67 ± 0,65	8,43 ± 0,65*

Для оценки реакции иммунокомпетентных органов были подготовлены мазки-отпечатки трахеобронхиальных и брыжечных лимфатических узлов. По данным медицинской литературы, клеточный состав неизменённого лимфатического узла на 92–98% представлен лимфоидными элементами. Очень редко в препаратах встречаются единичные лимфобласты. Остальные 2–5% составляют ретикулярные, плазматические клетки, макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы. При анализе полученных результатов в тканевых отпечатках трахеобронхиальных лимфоузлов, которые представлены в табл. 3, обращает на себя внимание, что суммарная доля зрелых лимфоцитов и пролимфоцитов в группе (NiO-НЧ) значительно меньше, чем в группе контроля. Обращает внимание статистически значимое увеличение количества макрофагов, что свидетельствует о заинтересованности фагоцитирующих элементов лимфатического узла в развитии реакции на металлосодержащие наночастицы [30–33]. При анализе мазков-отпечатков брыжечных лимфатических узлов после субхронического воздействия  $Al_2O_3$ -НЧ,  $TiO_2$ -НЧ,  $SiO_2$ -НЧ также отмечены статистически значимые процентные сдвиги зрелых лимфоцитов и пролимфоцитов в сравнении с контрольной группой.

## Обсуждение

Полученные результаты по способности Me-НЧ вызывать сенсибилизирующие эффекты не противоречат данным, которые описаны ранее в экспериментальных работах зарубежных авторов [34, 35]. Результаты цитологического исследования мазков-отпечатков показали, что процентное содержание эозинофилов достоверно повышалось при ингаляционном введении НЧ оксида никеля в лёгких и трахеобронхиальных лим-

фатических узлах. При внутрибрюшинном введении  $TiO_2$ -НЧ и  $SiO_2$ -НЧ приток эозинофилов отмечали в мазках-отпечатках печени и почек. Наряду с эозинофилией наблюдается достоверное увеличение нейтрофилов, однако говорить о развитии токсического воспаления гиперергического типа рано, так как мало данных о механизмах развития этого процесса и требуются дополнительные исследования.

При морфометрическом анализе следует отметить процентный сдвиг в сторону увеличения дегенеративно-дистрофических клеточных элементов (гепатоцитов, клеток проксимальных и дистальных канальцев почек, цилиндрического эпителия клеток бронхов). Особо нами отмечено увеличение клеток Купфера при разных путях введения Me-НЧ ( $Al_2O_3$ -НЧ, NiO-НЧ), но разной степени выраженности, что, возможно, связано с активацией резидентных макрофагов. Обращает на себя внимание при изучении цитологических препаратов увеличение макрофагов как в лёгких, так и в лимфатических узлах. Данные показатели свидетельствуют об активации местного клеточного иммунного ответа. Но не стоит забывать, что до определённого порога макрофаги могут оказывать как защитную функцию, так и в последующем и повреждающее действие на собственные клетки. Таким образом, изучение цитоморфологических показателей при воздействии Me-НЧ является дополнительным методом оценки их токсического влияния.

## Заключение

1. Результаты цитологического исследования мазков-отпечатков различных органов могут быть применены в изучении токсического действия металлосодержащих наночастиц в эксперименте по трём основным направлениям: оценке дегенеративно-дистрофических изменений, анализе активности и выраженности воспалительной реакции гиперергического типа, а также в изучении защитной реакции иммунокомпетентных органов.

2. Данный метод позволяет при минимальных временных затратах установить дистрофические изменения эпителия в таких органах, как лёгкие, печень и почки, как при острой, так и субхронической нанointоксикациях.

3. Наиболее показательные и статистически значимые цитоморфологические изменения были получены при анализе мазков-отпечатков лёгких и трахеобронхиальных лимфатических узлов после воздействия NiO-НЧ в оценке формирования воспалительной реакции гиперергического типа по полученным процентным сдвигам эозинофилов и сегментоядерных нейтрофилов.

4. Полученные данные по увеличению количества макрофагов в изучаемых органах (лёгкие, печень, лимфатические узлы) позволяют судить о формировании защитной реакции при изучении воздействия Me-НЧ при разных концентрациях и различных способах введения.

5. Применение метода совместно с гистологическим исследованием тканевых препаратов расширяет возможности для более полного морфологического и морфометрического анализа при исследовании токсических эффектов Me-НЧ.

Таблица 3

Некоторые цитологические характеристики тканевых мазков-отпечатков трахеобронхиальных лимфатических узлов крыс через сутки после 5-кратного ингаляционного воздействия наночастиц NiO в концентрации 1 мг/м<sup>3</sup>, в процентах от общего количества клеток ( $X_{cp} \pm S_x$ )

Показатель	Контроль	NiO-НЧ
Зрелые лимфоциты, пролимфоциты	91,80 ± 1,02	78,29 ± 3,48*
Лимфобласты	1,20 ± 0,37	3,29 ± 0,36*
Ретикулярные клетки	0,80 ± 0,20	0,57 ± 0,20
Плазмоциты	2,80 ± 0,37	7,57 ± 2,17
Макрофаги	1,20 ± 0,20	3,86 ± 0,63*

Примечание. \* – статистически значимое различие с группой «контроль» (при  $p \leq 0,05$  по  $t$ -критерию Стьюдента).

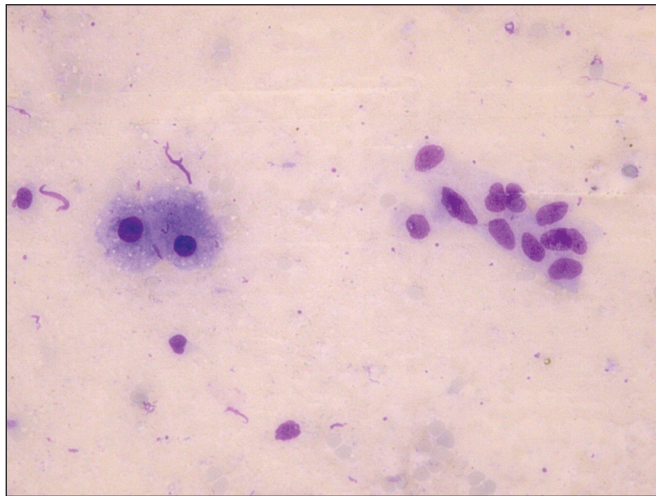
Литература (пп. 2–4, 9, 10, 13, 15, 17–30, 34, 35 см. References)

1. Глушкова А.В., Радилов А.С., Дулов С.А. Особенности проявления токсичности наночастиц. *Гигиена и санитария*. 2011; (2): 81–6.
5. Гонохова М.Н., Бойко Т.В., Ельцова А.А. Сравнительная цитоморфологическая характеристика селезёнки крыс при воздействии пестицидов. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; (6): 1056.
6. 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*. 2016; 3 (5): 22–30.
7. Кругликов Г.Г., Суслов В.Б. Особенности функциональной морфологии клеток на отпечатках органов, плёночных препаратах соединительной ткани и мазках крови. *Медико-биологические проблемы*. 2014; 4: 86–92.
8. Абрамов М.Г. *Клиническая цитология*. Изд. 2-е, испр. и доп. М.: Медицина; 1974. 336 с.
11. Петрова А.С., Птохова М.П. *Руководство по цитологической диагностике опухолей человека*. М.: Медицина; 1976.
12. Шабалова И.П. Современные возможности и перспективы клинической цитологии. *Новости клинической цитологии России*. 2014; 1 (1–2): 64.
14. Ташкэ К. *Введение в количественную цито-гистологическую морфологию*. Бухарест: изд-во АН СРР; 1980.
16. 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 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. *Бюллетень сибирской медицины*. 2008; 1: 32–6.
31. Шевалдин А.Г. Резидентные макрофаги печени и клинико-лабораторные показатели при хроническом гепатите С. *Актуальные вопросы инфекционной патологии. Материалы всерос. науч. конф. молодых учёных с международным участием*. СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. СПб., 2009. 34 с.
32. Элбакидзе Г.М. Механизмы протекторного действия активированных эндотоксином клеток Купфера на гепатоциты. *Вестник РАМН*. 2012; 5: 48–54.
33. Лямина С.В., Малышев И.Ю., Малышев И.Ю. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа. *Фундаментальные исследования*. 2014; 10 (5): 930–5.

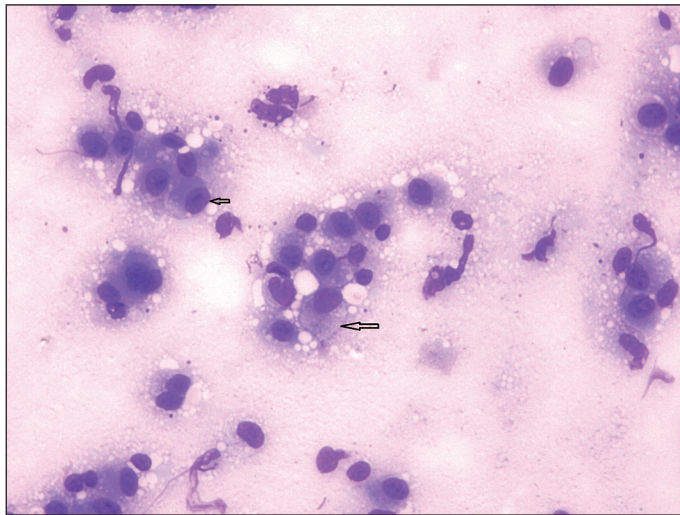
References

1. Glushkova A.V., Radilov A.S., Dulov S.A. Features of manifestation of nanoparticles toxicity. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2011; (2): 81–6. (in Russian)
2. Minigaliev I.A., Bushueva T.V., Fröhlich E., Meindl C., Panov V.G., Varaksin A.N. et al. Are *in vivo* and *in vitro* assessments of comparative and combined toxicity of the same metallic nanoparticles compatible, or contradictory, or both? A juxtaposition of data obtained in some experiments with NiO and Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Food Chem Toxicol*. 2017; 109 (1): 393–404. DOI: 10.1016/j.fct.2017.09.032.
3. 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 nanofoms. *Inhal Toxicol*. 2018; 4: 1–14. DOI: 10.1080/08958378.2018.1516834.
4. Bazeluk L.T., Duzbaeva N.M., Khanturina G.R. Temirtau Dust Chronic Exposure on Experimental Animals. *European Researcher*. 2013; 6 (1): 1618–23.
5. Gonohova M.N., Bojko T.V., El'cova A.A. Comparative cytomorphological characteristics of rat spleen exposed by pesticides. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; (6): 1056. (in Russian)
6. Dosynbaeva G.N. Cytomorphological assessment of bronchoalveolar lavage cells, liver and stomach when exposed to cotton dust, containing a organophosphorus pesticides in the experiment. *International Scientific and Practical Conference*. 2016; 3 (5): 22–30. (in Russian)
7. Kругликов Г.Г., Суслов В.Б. Features of the cell's functional morphology on imprints of organs, film preparations of connective tissue and blood smears. *Mediko-biologicheskiye problemy*. 2014; 4: 86–92.
8. Abramov M.G. *Clinical cytology [Klinicheskaya tsitologiya. Izd. 2, ispr. i dop.]*. Moscow: Meditsina; 1974. 336 p. (in Russian)
9. Bibbo M., Wilbur D. *Comprehensive cytopathology*. Saunders; 2008. 1136 p.
10. Tannenbaum M., Madden J.F., eds. *Diagnostic atlas of genitourinary pathology*. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. 492 p.
11. Petrova A.S., Ptohova M.P. *Guidelines for the cytological diagnosis of human tumors [Rukovodstvo po tsitologicheskoy diagnostike opukholey cheloveka]*. Moscow: Meditsina; 1976. (in Russian)
12. Shabalova I.P. Current opportunities and prospects of clinical cytology. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii*. 2014; 1 (1–2): 64. (in Russian)
13. Thompson D.W. Canadian experience in cytology proficiency testing. *Acta Cytol*. 1989; 33: 484–6.
14. Tashke K. *Introduction to quantitative cytological histological morphology [Vvedeniye v kolichestvennyuyu tsito-gistologicheskuyu morfologiyu]*. Bucharest: izd-vo AN SRR; 1980. (in Russian)
15. Minigaliev I.A., Katsnelson B.A., Privalova L.I., Sutunkova M.P., Gurvich 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. DOI: 10.3390/ijms19030837.
16. Mil'to I.V., Mihajlov G.A., Rat'kin A.V., Magaeva A.A. The effect of nano-sized particles on the morphology of the internal mouse organs during intravenous administration of a nanopowder solution Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2008; 1: 32–6. (in Russian)
17. Dumala N., Mangalampalli B., Chinde S., Kumari S., Mahoob M., Rahman M. et al. Genotoxicity study of nickel oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure. *Mutagenesis*. 2017; 32 (4): 417–27. DOI: 10.1093/mutage/gex007.
18. Oyabu T., Myojo T., Lee B-W., Okada T., Izumi H., Yoshiura Y. et al. Biopersistence of NiO and TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Following Intratracheal Instillation and Inhalation. *Int J Mol Sci*. 2017; 18 (12): 2757. DOI: 10.3390/ijms18122757.
19. Pilotti S., Rilke F., Alasio L. et al. The role fine needle aspiration in the assessment of renal masses. *Acta Cytol*. 1988; 32: 1–10.
20. Van Pelt J.F., Severi T., Crabbe T. et al. Expression of hepatitis C viruscore protein impairs DNA repair in human hepatoma cells. *Cancer Lett*. 2004; 209: 197–205. DOI: 10.1016/j.canlet.2003.11.035.
21. Morrison C., Marsh W., Frankel W.L. A comparison of CD10 to pCEA, MOC-31, and hepatocyte for the Distinction of malignant tumors in the liver. *Mod Pathol*. 2002; 15: 1279–87.
22. Yang G.C.H., Yang G.Y., Tao L.C. Cytologic features and histologic correlations of microacinar and microtrabecular types of well-differentiated hepatocellular carcinoma in fine needle aspiration biopsy. *Cancer Cytopathol*. 2004; 102: 27–33. DOI: 10.1002/cncr.20000.
23. Roberts R.A., Ganey P.E., Ju C. et al. Role of the Kupffer cell mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Sci*. 2007; 96 (1): 2–15. DOI: 10.1093/toxsci/kfl173.
24. Laudadio J., Christiansen L., Mostafa F. et al. The diagnostic utility of the differential cell count of the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in patients with interstitial lung disease. *Ca (Ca Cytopath suppl)*. 2005; 105: 402.
25. Romagosa C., Morente V., Ramirez J.F. et al. Intracellular inclusions in fine needle aspirates of bronchial low grade mucocoeperimoid carcinoma with clear cell change. A report of two cases. *Acta Cytol*. 2002; 46: 57–60. DOI: 10.1159/000326717.
26. Fűezesi L., Höer P.-W., Schmidt W. Exfoliative cytology of multiple endobronchial granular cell tumor. *Acta Cytol*. 1989; 33: 516–8.
27. Tsykunov V.M., Andreev V.P., Kravchuk R.I., Prokopchic N.I. Clinical cytology of liver: Cupffer's cells. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2017; 15 (4): 419–31.
28. Naito M., Hasegawa G., Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech*. 1997; 39 (4): 350–64.
29. Sutunkova M.P., Solovyeva S.N., Minigaliev I.A., Gurvich V.B., Makeyev O.H., Shur V.Y. et al. Toxic Effects of Low-Level Long-Term Inhalation Exposures of Rats to Nickel Oxide Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (7): 1778. DOI: 10.3390/ijms20071778.
30. Zigmund E. 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. DOI: 10.4049/jimmunol.1400574.
31. Shevaldin A.G. Resident liver macrophages and clinical and laboratory parameters in chronic hepatitis C. *Aktual'nye voprosy infekcionnoj patologii. Materials of the All-Russian scientific conference of young scientists with international participation*. SPbGMU named after Acad. I.P. Pavlov. St. Petersburg, 2009. p. 34.
32. Elbakidze G.M. Mechanisms of the protective action of Kupffer cells activated by endotoxin on hepatocytes. *Vestnik RAMN*. 2012; 5: 48–54.
33. Lyamina S.V., Malyshev I.Yu., Malyshev I.Yu. Macrophage polarization in the modern concept of the immune response formation. *Fundamental'nyye issledovaniya*. 2014; 10 (5): 930–5.
34. Lee S., Hwang S-H., Jeong J., Han Y., Kim S.-H., Lee D-K. et al. Nickel oxide nanoparticles can recruit eosinophils in the lungs of rats by the direct release of intracellular eotaxin. *Part Fibre Toxicol*. 2016; 13: 30. DOI: 10.1186/s12989-016-0142-8.
35. Radauer-Preiml I., Andosch A., Hawranek T., Luetz-Meindl U., Wiederstein M., Horejs-Hoecel J. Nanoparticle-allergen interactions mediate human allergic responses: protein corona characterization and cellular responses. *Part Fibre Toxicol*. 2016; 13: 3. DOI: 10.1186/s12989-016-0113-0.

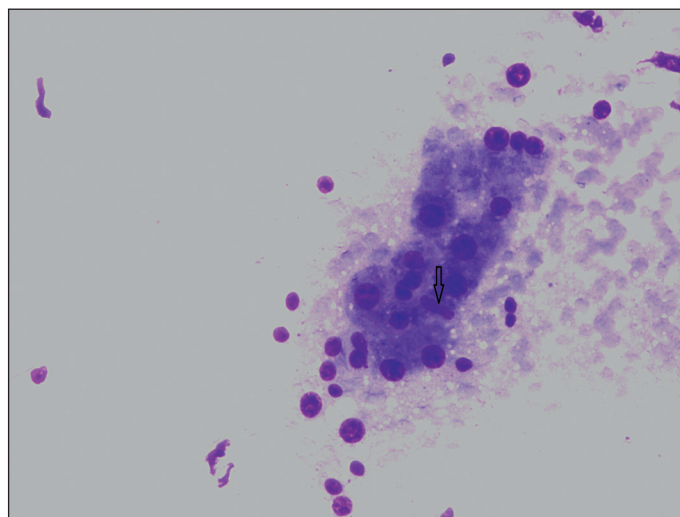
*К ст. Р.Р. Сахаутдиновой и соавт.*



**Рис. 1.** Мазок-отпечаток лёгкого крысы при 5-кратном ингаляционном воздействии наночастиц NiO в концентрации 1 мг/м<sup>3</sup>. Цилиндрический эпителий бронхов с дегенеративно-дистрофическими изменениями. Альвеолярные макрофаги. Окраска по Лейшману, увеличение x40.



**Рис. 2.** Мазок-отпечаток лёгкого крысы при 5-кратном ингаляционном воздействии наночастиц NiO в концентрации 1 мг/м<sup>3</sup>. Альвеолярные макрофаги. Окраска по Лейшману, увеличение x40.



**Рис. 3.** Мазок-отпечаток печени крысы при 5-кратном ингаляционном воздействии наночастиц NiO в концентрации 1 мг/м<sup>3</sup>. Группы гепатоцитов. Клетка Купфера. Окраска по Лейшману, увеличение x40.