

## Реакция Iba-1+ и CD68+ макрофагов печени лабораторных крыс на двухмесячное поступление водорастворимого кремния

Е.А. Григорьева<sup>1</sup>, В.С. Гордова<sup>2</sup>, В.Е. Сергеева<sup>1</sup>, А.Т. Смородченко<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

<sup>3</sup> Медицинская школа Берлина – Университет здоровья и медицины, Берлин, Германия

**Резюме. Введение.** Соединения кремния широко используются в промышленном производстве, поэтому вероятность постоянного контакта человека с этим микроэлементом чрезвычайно высока. Изучение реакции макрофагов печени позволит получить новые данные об их возможном участии в воспалительном процессе, индуцированном поступающим с водой кремнием. Цель исследования – изучить реакцию Iba-1+ и CD68+ клеток печени лабораторных крыс на поступление кремния с питьевой водой в концентрации 10 мг/л в течение 2 месяцев.

**Материалы и методы.** Лабораторные крысы были разделены на две группы: контрольная (n=5) получала питьевую бутилированную воду *ad libitum*, опытная (n=5) – ту же самую воду, но с добавлением девятиводного метасиликата натрия ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ ) в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний, что соответствовало предельно допустимой, согласно СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества», действующим на момент проведения исследования. Животные были выведены из эксперимента через 2 месяца. Печень извлечена и фиксирована в 10% нейтральном формалине и залита в парафин по стандартному протоколу. Для выявления Iba1+ и CD68+ структур использовали иммуногистохимический и иммунофлуоресцентный методы с применением специфических антител.

**Результаты.** Сравнительный анализ экспрессии двух маркеров макрофагов показал, что медиана площади Iba-1+ клеток в печени крыс опытной группы уменьшилась в 0,87 раза по сравнению с печенью крыс контрольной группы (p=0,000006). В печени крыс опытной группы возрастало количество как Iba-1+ (p=0,02), так и CD68+ клеток (p=0,01). Выявлены уменьшение интенсивности иммунофлуоресценции в Iba-1+ клетках печени крыс опытной группы (p=0,01) и увеличение ее в CD68+ клетках (p=0,27).

**Заключение.** Поступление водорастворимого кремния в концентрации 10 мг/л приводит к активации макрофагов печени за относительно небольшой срок воздействия (2 месяца). В связи с этим следует придать большее значение изучению вопроса безопасности соединений кремния в условиях их постоянного поступления.

**Ключевые слова:** кремний, водорастворимые силикаты, печень, CD68-позитивные клетки, Iba-1-позитивные клетки, макрофаги, M1-поляризованные макрофаги

**Для корреспонденции:** Евгения Александровна Григорьева. E-mail: shgrev@yandex.ru

**Для цитирования:** Григорьева Е.А., Гордова В.С., Сергеева В.Е., Смородченко А.Т. Реакция Iba-1+ и CD68+ макрофагов печени лабораторных крыс на двухмесячное поступление водорастворимого кремния. Клини. эксп. морфология. 2024;13(1):50–58. DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.50-58.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Статья поступила 22.05.2023. Получена после рецензирования 05.06.2023. Принята в печать 20.06.2023.

## Effect of a two-month water-soluble silicon intake on Iba1+ and CD68+ liver macrophages in laboratory rats

Е.А. Grigoreva<sup>1</sup>, V.S. Gordova<sup>2</sup>, V.E. Sergeeva<sup>1</sup>, A.T. Smorodchenko<sup>3</sup>

<sup>1</sup> IN Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russia

<sup>2</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

<sup>3</sup> Medical School Berlin – University of Health and Medicine, Berlin, Germany

**Abstract. Introduction.** Silicon compounds are widely used in industrial production; therefore, people are highly likely to have constant contact with this element. Hepatic macrophages are crucial in maintaining homeostasis in the liver; thus, investigating their reaction can provide new information on their possible

participation in the inflammation induced by silicon supplied with water. The aim was to explore how Iba1+ and CD68+ liver cells in laboratory rats respond to the intake of silicon with drinking water at a concentration of 10 mg/l during two months.

**Materials and methods.** Laboratory rats were divided into 2 groups: the control group (n=5) received drinking bottled water *ad libitum*, whereas the experimental one was given the same water with addition of sodium metasilicate nonahydrate ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ ) at a concentration of 10 mg/l in terms of silicon. This corresponded to the maximum allowable concentration, according to SanPiN 2.1.4.1074-01 in force at the time of the experiment. The animals were withdrawn from the experiment 2 months after had begun. The liver was removed and fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin according to the standard protocol. Iba1+ and CD68+ structures were detected with immunohistochemical and immunofluorescence methods using specific antibodies.

**Results.** We compared the expression patterns of the two macrophage markers and detected that in the experimental group, the median area of Iba1-positive cells in the livers of rats had a 0.87-time decrease compared to that in the control group ( $p=0.000006$ ). The experimental group showed an increase in the number of Iba1+ and CD68+ cells ( $p=0.02$  and  $p=0.01$ , respectively). We revealed that in the experimental group, immunofluorescence in Iba1+ liver macrophages decreased ( $p=0.01$ ), whereas that in CD68+ macrophages increased ( $p=0.27$ ).

**Conclusion.** The intake of water-soluble silicon at a concentration of 10 mg/l activates liver macrophages in a relatively short period of exposure (two months). Therefore, the safety of silicon compounds in the conditions of their constant supply should be studied more thoroughly.

**Keywords:** silicon, water-soluble silicates, liver, CD68-positive cells, IBA1-positive cells, macrophages, M1-polarized macrophages

**Corresponding author:** Evgeniia A. Grigoreva. E-mail: shgrev@yandex.ru

**For citation:** Grigoreva E.A., Gordova V.S., Sergeeva V.E., Smorodchenko A.T. Effect of a two-month water-soluble silicon intake on Iba-1+ and CD68+ liver macrophages in laboratory rats. *Clin. exp. morphology*. 2024;13(1):50–58 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.50-58.

**Funding.** The study was carried out within the framework of state budget funding.

**Received 22.05.2023. Received in revised form 05.06.2023. Accepted 20.06.2023.**

## Введение

Кремний является вторым по распространенности микроэлементом в природе. Среднесуточная доза кремния, поступающего в организм человека, варьирует от 10–24 до 140–204 мг в сутки и зависит от рациона питания и региона проживания. В настоящее время различные соединения кремния активно используются в косметическом, пищевом и фармацевтическом производстве. Следовательно, человек получает кремний не только в составе воды и пищевых продуктов, таких как злаковые, овощи, морепродукты, но и в составе пищевых добавок, лекарственных препаратов и других веществ [1].

Кремний, поступающий в организм человека в составе разных его соединений, под воздействием соляной кислоты желудка способен расщепляться до биодоступной формы – ортокремниевой кислоты. Последняя обладает свойством диффундировать через мембраны эпителия слизистой оболочки кишечника и попадать в кровотоки [2].

Макрофаги – многочисленная группа клеток, отличающихся друг от друга по онтогенезу, морфологии, распределению в тканях и функциям, трансформирующихся с дифференцированием в различные фенотипы, необходимые для иммунного ответа. Они играют важную роль в патогенезе многих заболеваний печени. Резидентными макрофагами печени являются клетки Купфера. В ответ на воздействие разных про-

воцирующих воспалению факторов макрофаги печени активируются, высвобождают цитокины и хемокины и привлекают циркулирующие в крови моноциты. В результате этого происходит либо усугубление симптомов того или иного заболевания, либо, наоборот, активация репарации [3–5].

Изучение роли макрофагов в воспалении позволило разделить их на две противоположные по функциям популяции – M1 и M2, где M1-поляризованные макрофаги реализуют цитотоксичность, поддерживая воспаление, а M2-поляризованные ответственны за процессы репарации [6, 7]. Фенотипически M1-поляризованные макрофаги экспрессируют MHC II класса, CD68, CD80, CD86 [8]. В то же время Iba-1-позитивные клетки могут менять поляризацию с M1 на M2 [9].

Антитело к белку Iba-1, относящемуся к кальций-связывающим пептидам, обычно используется для идентификации клеток микроглии в тканях головного мозга. Тем не менее Iba-1-позитивные клетки выявляются и в других тканях и органах, например в печени. При этом они, как правило, участвуют в процессах воспаления, миграции клеток, пролиферации и передачи сигнала посредством продукции цитокинов. Экспрессия Iba-1 и CD68 в разных клетках может отличаться. Белок Iba-1 обнаруживается на поверхности всех клеток моноцитарно-макрофагального происхождения, в том числе макрофагов, которые экспрессируют на своей поверхности CD163, CD16 и CD68. Известно, что средние

размеры Iba-1-позитивных клеток печени могут уменьшаться при воспалительных процессах этого паренхиматозного органа, в том числе их морфология коррелирует со стадиями фиброза печени. В то же время CD68 экспрессируется преимущественно только на поверхности активированных макрофагов [4, 10, 11]. Маркер CD68 – представитель семейства скавенджер-рецепторов, следовательно, его экспрессия повышается на макрофагах, отвечающих за воспалительные стимулы [6].

В исследованиях H.L. Herd et al. выявлено, что наибольшее поглощение наночастиц кремнезема наблюдалось клетками печени, относящимися к M1-поляризованным макрофагам [12]. Эксперимент с внутрибрюшным введением мезопористых наночастиц кремнезема (50 мг/кг) показал, что активированные клетки Купфера печени способны высвобождать цитокины (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), приводящие к развитию воспалительного процесса и образованию силикотических узелков в печени, подобно механизму развития силикоза легких [13].

Наши ранние гистологические исследования, связанные с изучением реакции CD68+ клеток печени лабораторных крыс, получавших кремний с питьевой водой в течение 9 месяцев, показали, что хроническое поступление этого микроэлемента приводит к увеличению количества данных клеток в поле зрения, уменьшению площади макрофагов за счет роста доли клеток малого размера, а также повышению экспрессии CD68 на их поверхности [2].

Цель исследования – изучить реакцию Iba-1- и CD68-позитивных клеток печени лабораторных крыс на поступление кремния с питьевой водой в концентрации 10 мг/л в течение 2 месяцев.

## Материалы и методы

Эксперимент проведен на лабораторных нелинейных крысах – самцах 3-месячного возраста, содержащихся в обычных условиях вивария при естественном освещении. Крысы были разделены на группы – контрольную (n=5) и опытную (n=5). Первые получали питьевую бутилированную воду *ad libitum* в течение 2 месяцев, вторые – ту же самую воду, но с добавлением девятиводного метасиликата натрия в концентрации 10 мг/л в перерасчете на кремний. Данная концентрация кремния в питьевой воде соответствовала предельно допустимой, согласно СанПиН 2.1.4.1074-01, действующим на момент эксперимента. Исследование проводилось в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Дизайн исследования одобрен этическим комитетом медицинского факультета Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова (протокол № 3 от 12.11.2021).

Через 2 месяца крысы были выведены из эксперимента путем цервикальной дислокации, после чего извлекалась печень, которую в дальнейшем фиксиро-

вали в 10% нейтральном формалине, обезживали и заливали в парафин по стандартной методике [2]. Для выявления Iba1+ и CD68+ структур использовали иммуногистохимический метод и непрямой иммунофлуоресцентный метод с применением специфических антител (АТ): первичные (кроличьи АТ против белка Iba-1 (1:500, Wako, Япония) и мышинные АТ против белка CD68 (1:500, Abcam, Великобритания); вторичные (биотилинированные АТ (1:500, goat anti-rabbit IgG, goat anti-mouse IgG, Vector Laboratories, США) и АТ с флуоресцентной меткой (1:500, goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa 594, goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa 488, Thermo Fischer Scientific, КНР). Парафиновые срезы толщиной 6 мкм приготовлены с помощью микротомы Leica SM2010 (Leica Biosystems, Германия) и депарафинированы. Демаскирование антигена проводили путем кипячения срезов в 1% цитратном буфере в течение 10 минут с последующим охлаждением их до комнатной температуры. Эндogenous пероксидазную активность подавляли в 3% растворе перекиси водорода в течение 30 минут. После этого препараты трехкратно промывали в 0,1 М фосфатном буфере. Блокирование неспецифического связывания АТ осуществляли с помощью инкубации срезов в течение 60 минут с 10% козьей сывороткой при комнатной температуре. Для иммуногистохимического окрашивания инкубацию с первичными АТ проводили в течение 18 часов при +4°C, со вторичными АТ – 60 минут при комнатной температуре. Потом срезы обрабатывали авидин-пероксидазным комплексом (ABC Standard, Vector Laboratories, США). Далее проводили инкубацию с 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлоридом (Sigma-Aldrich, США), придававшим детектирующимся структурам темно-коричневый цвет. Для непрямого иммунофлуоресцентного анализа срезы были инкубированы с теми же первичными АТ, но в качестве вторичных использовали АТ с флуоресцентной меткой (60 минут при комнатной температуре). После очередного трехкратного промывания в 0,1 М фосфатном буфере срезы были покрыты покровным стеклом и хранились в темноте при температуре +4°C до микроскопического исследования.

Флуоресцентную микроскопию проводили с помощью микроскопа BX51 Olympus microscope (Olympus, Япония). Для подсчета маркированных иммуногистохимическим методом Iba-1- и CD68-позитивных клеток, измерения площади, занимаемой ими на микрофотографиях (площадь микрофотографии = 93119,06 мкм<sup>2</sup>), использовали микроскоп МИКМЕД-6 (АО «ЛОМО», Россия) при увеличении объектива  $\times 40$  и цифровой камеры с программным обеспечением MU1000 (AmScore, США). Интенсивность флуоресценции измеряли с применением программы ImageJ [14, 15].

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0. Площадь Iba-1 и CD68-позитивных клеток распределяли автоматически на десять категорий на гистограмме. Среди них выделя-

ли три наиболее многочисленные категории: малые, средние и большие макрофаги. Площадь клеток, составляющих правый хвост гистограммы, объединяли в группу очень больших макрофагов. Кроме того, для определения формы измеряемых клеток была использована методика, апробированная на ядрах клеток [16]. Базируясь на этом методе, были измерены коэффициент формы (КФ) ( $KF = 4 \times \pi \times S_{\text{я}}/P_{\text{я}}^2$ ) и индекс контура (ИК) клетки, отражающий рельеф его поверхности ( $IK = P_{\text{я}}/\sqrt{S_{\text{я}}}$ , где  $S_{\text{я}}$  – площадь клетки,  $P_{\text{я}}$  – периметр клетки). При этом круг имеет коэффициент формы, который равняется 1, и индекс контура – 3,54.

Полученные в ходе измерения выборки проверяли на нормальность распределения с использованием критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова. В случае нормального распределения изучаемого признака данные представляли как среднюю арифметическую со стандартной ошибкой среднего значения, в виде  $M \pm m$ . Статистическую значимость отличий определяли с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. При ненормальном распределении выборок данные представлялись как медиана ( $Me$ ) и интерквартильный размах ( $Q1; Q3$ ). В этом случае для определения статистической значимости использовали U-критерий Манна–Уитни. Различия в обоих случаях считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Микроскопическое изучение печени крыс контрольной и опытной групп, находившихся в эксперименте

в течение 2 месяцев, показало, что морфологическая картина изучаемого органа в обеих экспериментальных группах не сильно отличалась. Обращало на себя внимание некоторое расширение центральных вен печеночных долек в печени крыс опытной группы.

Iba-1+ и CD68+ клетки при иммуногистохимическом окрашивании имели разную степень интенсивности коричневой окраски и разную форму (от округлой до вытянутой с отростками). Они располагались около центральных вен печеночных долек, между печеночными балками и в области портальных трактов. При визуальном осмотре микрофотографий было отмечено, что в печени крыс опытной группы Iba-1+ клетки имели преимущественно светло-коричневую окраску, следовательно, интенсивность реакции в этих клетках по сравнению с контрольной группой была ниже. Iba-1+ клетки в сравнении с CD68+ клетками имели визуально бóльшие размеры и были более отростчатыми (рис. 1).

Результаты морфометрии подтвердили наши визуальные наблюдения (табл. 1). Так, медиана площади Iba-1+ клеток в печени крыс опытной группы уменьшилась в 0,87 раза ( $p=0,000006$ ), а медиана их периметра – в 0,96 раза ( $p=0,08$ ). Распределение клеток по площади на малые, средние, большие и очень большие выявило, что среди Iba-1+ клеток наблюдается увеличение доли малых и средних, а также статистически значимое уменьшение доли больших по размеру клеток ( $p=0,03$ ) (табл. 2). Медиана площади CD68+ клеток печени крыс опытной группы в сравнении с контрольной

Таблица 1 | Table 1

Сравнение количественных и качественных характеристик Iba-1+ и CD68+ макрофагов печени лабораторных крыс | Comparison of quantitative and qualitative characteristics of Iba1+ and CD68+ liver macrophages in laboratory rats

Параметры   Parameters	Iba-1+ макрофаги   Iba1+ macrophages		CD68+ макрофаги   CD68+ macrophages	
	контрольная группа   control group	опытная группа   experimental group	контрольная группа   control group	опытная группа   experimental group
Площадь макрофагов, $\mu\text{м}^2$   Area of macrophages, $\mu\text{m}^2$	43,44 (26,61; 69,83)	37,87 (23,33; 58,95)*	29,95 (17,69; 47,30)	29,85 (18,23; 48,36)
Периметр макрофагов, $\mu\text{м}$   Perimeter of macrophages, $\mu\text{m}$	28,61 (20,21; 41,01)	27,50 (19,65; 38,43)*	22,88 (15,44; 31,69)	21,87 (15,75; 29,89)
Площадь, занимаемая макрофагами, относительно площади микрофотографии, %   Area occupied by macrophages relative to the area of photographs, %	1,23 (0,94; 1,95)	1,43 (1,23; 1,90)	1,01 (0,90; 1,18)	1,25 (0,95; 1,85)*
Индекс контура клетки   Cellular contour index	4,34 (3,93; 4,89)	4,48 (4,07; 5,00)*	4,19 (3,68; 4,59)	3,99 (3,67; 4,30)*
Коэффициент формы клетки   Cellular form	0,66 (0,52; 0,81)	0,63 (0,50; 0,75)*	0,71 (0,59; 0,92)	0,79 (0,31; 1,31)*

\* статистически значимые различия  $p < 0,05$

\* significant differences at  $p < 0.05$



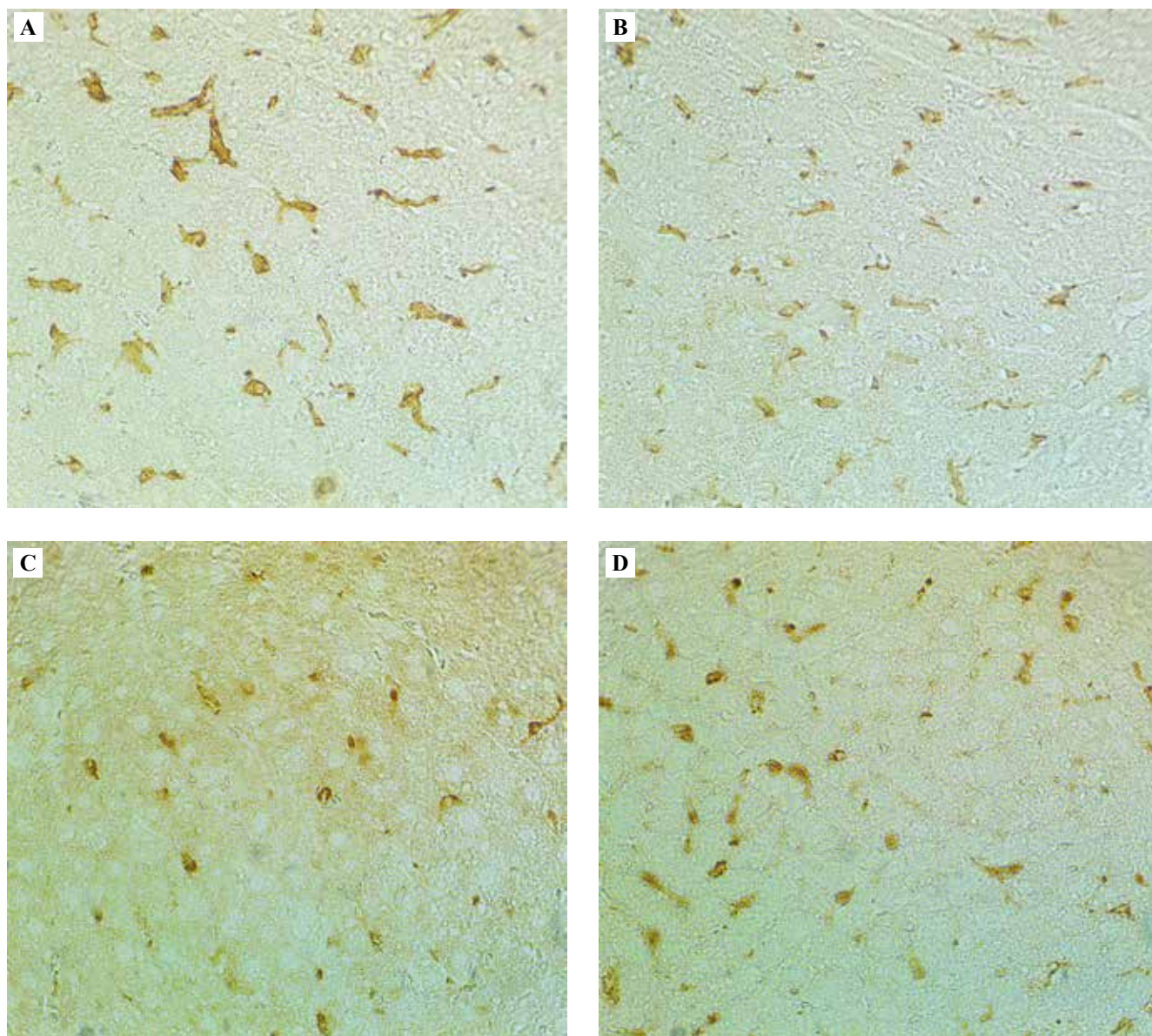


Рис. 1. Iba-1+ и CD68+ клетки печени лабораторных крыс, выявленные иммуногистохимическим методом,  $\times 400$ .

А, В – Iba-1+ клетки печени крыс, С, D – CD68+ клетки печени крыс. А, С – печень крыс контрольной группы.

В, D – печень крыс опытной группы

Fig. 1. Iba-1+ and CD68+ rat liver cells detected by immunohistochemistry,  $\times 400$ .

А, В – Iba-1+ rat liver cells, С, D – CD68+ rat liver cells. А, С – livers of the rats from the control group.

В, D – livers of the rats from the experimental group

ной практически не изменялась ( $p=0,63$ ). Отмечено небольшое увеличение доли макрофагов очень больших размеров. Уменьшалось значение медианы периметра клеток в 0,95 раза ( $p=0,10$ ). При определении коэффициента формы и индекса контура клеток выявлено, что CD68+ макрофаги крыс опытной группы имели наиболее приближенные показатели к значениям идеального круга.

Среднее количество Iba-1+ и CD68+ клеток печени крыс на микрофотографию составило  $26,38 \pm 0,62$  и  $26,53 \pm 1,75$  для контрольной группы,  $34,24 \pm 2,59$

и  $32,87 \pm 1,64$  для опытной. Следовательно, наблюдалось возрастание Iba-1+ клеток в 1,29 раза ( $p=0,02$ ), CD68+ клеток в 1,32 раза ( $p=0,01$ ) в печени крыс опытной группы. Медиана площади, занимаемой Iba-1+ и CD68+ макрофагами, относительно площади микрофотографии увеличивалась в 1,16 ( $p=0,38$ ) и 1,23 ( $p=0,01$ ) раза, соответственно.

С помощью программы ImageJ была замерена интенсивность иммунофлуоресценции каждой Iba-1+ и CD68+ клетки отдельно. Выявлено уменьшение интенсивности иммунофлуоресценции в Iba-1+ клетках

(красная флуоресценция) печени крыс опытной группы в 0,89 раза ( $p=0,01$ ) и увеличение ее в CD68+ структурах (зеленая флуоресценция) в 1,05 раза ( $p=0,27$ ). Полученные данные были представлены в виде графиков, построенных с использованием плагина Graphics RGB Profile Plot программы ImageJ по микрофотографиям препарата печени крыс контрольной и опытной групп с одновременной реакцией на Iba-1 и CD68 (рис. 2).

### Обсуждение

При сравнении наших предыдущих результатов [2], полученных при изучении реакции CD68+ клеток печени лабораторных крыс в эксперименте с поступлением кремния в течение 9 месяцев, были выявлены некоторые схожие реакции, а именно увеличение количества CD68+ клеток в поле зрения у крыс опытной группы. Площадь CD68+ клеток печени крыс, находившихся в эксперименте в течение 9 месяцев, была несколько больше, чем у крыс, находившихся в эксперименте 2 месяца. Мы предполагаем, что данные различия отчасти связаны как с возрастными особенностями животных, так и с длительностью воздействия водорастворимого кремния. Например, в исследованиях макрофагов перитонеальной жидкости мышей разных возрастных групп выявлены увеличение содержания липофусцина с возрастом и усиление окислительных процессов в организме животных, в которых фагоциты играют ключевую роль, способствуя иммуностарению [17].

Известно, что макрофаги, экспрессирующие Iba-1, способны также экспрессировать CD68 [11]. Наши результаты показывают, что медиана последних входит в состав доли Iba-1+ макрофагов малых размеров, а квартильный размах (Q1; Q3) – в долю малых и средних по размеру. Это же подтверждает коэкспрессия красной (Iba-1) и зеленой (CD68) флуоресценции в одних и тех же клетках (рис. 2 А, В). Увеличение среднего количества Iba-1+ и CD68+ клеток в печени крыс опытной группы, скорее всего, происходит за счет привлечения из циркулирующей крови моноцитов, что вполне объясняет также увеличение доли Iba-1+ клеток малого размера и уменьшение их медианы площади. Графики интенсивности флуоресценции Iba-1+ и CD68+ структур печени крыс (рис. 2 С, D) наглядно показывают усиление интенсивности флуоресценции CD68 и уменьшение интенсивности флуоресценции Iba-1 в печени крыс опытной группы. Возможно, что некоторые макрофаги с коэкспрессией из-за развивающегося воспалительного процесса в печени в большей степени экспрессируют маркер CD68 на своей поверхности, перекрывающий флуоресценцию Iba-1. Известно, что наночастицы кремнезема могут вызывать активацию клеток Купфера и способствовать высвобождению ими воспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) [13]. Наблюдаемые изменения, в целом, подтверждают наши предположения об активации CD68+ макрофагов, которые, в свою очередь, способны индуцировать воспалительный процесс. Исходя из сведений о том, что Iba-1+ клетки могут менять свою поляризацию и могут быть

Таблица 2 | Table 2

Распределение популяций Iba1+ и CD68+ макрофагов по размеру клеток, % |  
Distribution of Iba1+ and CD68+ macrophage populations by cell size, %

Размеры макрофагов   Macrophage sizes	Площадь, мкм <sup>2</sup>   Area, $\mu\text{m}^2$	Доля Iba-1+ макрофагов   Proportion of Iba1+ macrophages		Площадь, мкм <sup>2</sup>   Area, $\mu\text{m}^2$	Доля CD68+ макрофагов   Proportion of CD68+ macrophages	
		контрольная группа, %   control group, %	опытная группа, %   experimental group, %		контрольная группа, %   control group, %	опытная группа, %   experimental group, %
Малые макрофаги   Small macrophages	4,45–35,46	39	47	1,85–19,79	30	28
Средние макрофаги   Medium macrophages	35,46–66,48	33	36	19,79–37,73	33	35
Большие макрофаги   Large macrophages	66,48–97,49	17	11*	37,63–55,67	20	18
Очень большие макрофаги   Very large macrophages	>97,49	11	6	>55,67	17	19

\* статистически значимое различие между контрольной и опытной группами  $p=0,03$

\* significant differences between the control and experimental groups at  $p=0.03$



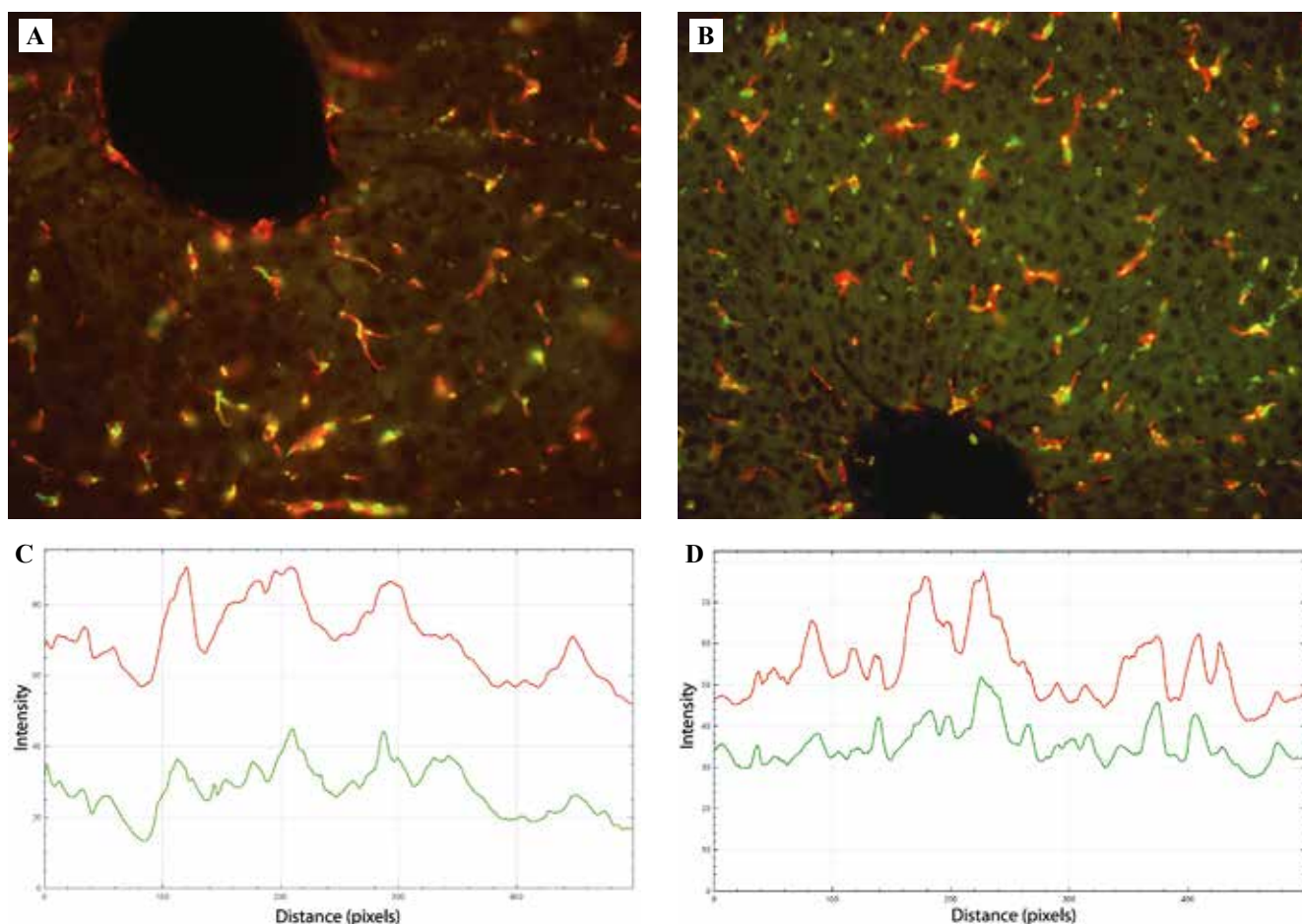


Рис. 2. А, В – иммунофлуоресценция Iba-1+ и CD68+ клеток печени крыс.  $\times 400$ . Iba-1 – красная флуоресценция; CD68 – зеленая флуоресценция. С, D – графики интенсивности флуоресценции Iba-1+ и CD68+. Красная линия графика отображает интенсивность иммунофлуоресценции Iba-1+ клеток, зеленая линия – CD68+ клеток.

А, С – печень крыс контрольной группы. В, D – печень крыс опытной группы

Fig. 2. А, В – immunofluorescence of Iba1+ and CD68+ rat liver cells.  $\times 400$ . Iba1 – red fluorescence; CD68 – green fluorescence. С, D – fluorescence intensity plots for Iba1+ and CD68+. The intensity of immunofluorescence of Iba1+ cells (red line), CD68+ cells (green line).

А, С – livers of the rats from the control group. В, D – livers of the rats from the experimental group

как M1-поляризованными, так и M2-поляризованными макрофагами [9], вполне вероятно, что Iba-1+ клетки, не экспрессирующие CD68, участвуют в процессах репарации печени или также поддерживают воспалительный процесс, но уже в коэкспрессии с другим маркером [18].

### Заключение

Поступление кремния с питьевой водой в течение 2 месяцев в концентрации 10 мг/л приводит к увеличению количества Iba-1+ и CD68+ макрофагов печени лабораторных крыс и уменьшению площади Iba-1+ макрофагов за счет увеличения доли малых макрофагов; вызывает изменение интенсивности иммунофлуоресценции Iba-1+ и CD68+ клеток в сторону уменьшения реакции на Iba-1 и, напротив, увеличение реакции на CD68. Обнаруженные нами изменения свидетельствуют о том, что водорастворимый кремний приводит к ак-

тивации макрофагов, а значит, и иммунной системы даже при относительно небольшом сроке (2 месяца) воздействия. Следовательно, водорастворимые формы кремния, так же, как и наночастицы кремнезема, могут оказывать провоспалительное действие.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.А. Григорьева, В.С. Гордова, В.Е. Сергеева.

Сбор и обработка материала – Е.А. Григорьева, А.Т. Смородченко.

Написание текста – Е.А. Григорьева.

Редактирование – В.С. Гордова, В.Е. Сергеева, А.Т. Смородченко.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Е.А. Grigoreva, V.S. Gordova, V.E. Sergeeva.

Collected the data and performed the analysis – Е.А. Grigoreva, А.Т. Smorodchenko.

Wrote the paper – Е.А. Grigoreva.

Edited the manuscript – V.S. Gordova, V.E. Sergeeva, А.Т. Smorodchenko.

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

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

## Литература/References

1. Григорьева Е.А., Гордова В.С., Сергеева В.Е. Влияние наночастиц кремния и водорастворимых силикатов на печень (сравнение результатов собственных исследований с литературными данными). *Acta Medica Eurasica*. 2022;4:108–120. DOI: 10.47026/2413-4864-2022-4-108-120.  
*Grigoreva EA, Gordova VS, Sergeeva VE*. The effect of silicon nanoparticles and water-soluble silicates on the liver (comparison of our own research results with literature data). *Acta Medica Eurasica*. 2022;4:108–120 (In Russ.). DOI: 10.47026/2413-4864-2022-4-108-120.
2. Григорьева Е.А., Гордова В.С., Сергеева В.Е., Смородченко А.Т. Реакция CD68-позитивных клеток печени и селезенки крыс на поступление кремния с питьевой водой. *Acta Medica Eurasica*. 2021;2:34–43. DOI: 10.47026/2413-4864-2021-2-34-43.  
*Grigoreva EA, Gordova VS, Sergeeva VE, Smorodchenko AT*. Reaction of CD68-positive rat liver and spleen cells on silicon intake with drinking water. *Acta Medica Eurasica*. 2021;2:34–43 (In Russ.). DOI: 10.47026/2413-4864-2021-2-34-43.
3. Colino CI, Lanao JM, Gutierrez-Millan C. Targeting of hepatic macrophages by therapeutic nanoparticles. *Front Immunol*. 2020;11:218. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00218.
4. Yamate J, Izawa T, Kuwamura M. Histopathological analysis of rat hepatotoxicity based on macrophage functions: in particular, an analysis for thioacetamide-induced hepatic lesions. *Food Saf (Tokyo)*. 2016;4(3):61–73. DOI: 10.14252/foodsafetyfscj.2016012.
5. Джалилова Д.Ш., Косырева А.М., Диатроптов М.Е., Макарова М.А., Макарова О.В. Морфология печени и легких и фагоцитарная активность клеток периферической крови при системной воспалительной реакции у самцов крыс с разной устойчивостью к гипоксии. Клиническая и экспериментальная морфология. 2019;8(1):47–55. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-47-55.  
*Dzhalilova DSh, Kosyreva AM, Diatroptov ME, Makarova MA, Makarova OV*. Liver and lung morphology and phagocytic activity of peripheral blood cells during systemic inflammatory response in male rats with different resistance to hypoxia. *Clinical and experimental morphology*. 2019;8(1):47–55 (In Russ.). DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-47-55.
6. Wang C, Ma C, Gong L, Guo Y, Fu K, Zhang Y et al. Macrophage polarization and its role in liver disease. *Front Immunol*. 2021;12:803037. DOI: 10.3389/fimmu.2021.803037.
7. Федоров А.А., Ермак Н.А., Геращенко Т.С., Топольницкий Е.Б., Шефер Н.А., Родионов Е.О. и др. Поляризация макрофагов: механизмы, маркеры и факторы индукции. Сибирский онкологический журнал. 2022;21(4):124–136. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-4-124-136.  
*Fedorov AA, Ermak NA, Gerashchenko TS, Topolnitskiy EB, Shefer NA, Rodionov EO et al*. Polarization of macrophages: mechanisms, markers and factors of induction. *Siberian Journal of Oncology*. 2022;21(4):124–136 (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-4-124-136.
8. Huang X, Li Y, Fu M, Xin HB. Polarizing macrophages in vitro. *Methods Mol Biol*. 2018;1784:119–26. DOI: 10.1007/978-1-4939-7837-3\_12.
9. Chen H, Feng Z, Min L, Deng W, Tan M, Hong J et al. Vagus nerve stimulation reduces neuroinflammation through microglia polarization regulation to improve functional recovery after spinal cord injury. *Front Neurosci*. 2022;16:813472. DOI: 10.3389/fnins.2022.813472.
10. Stankov A, Belakaposka-Srpanova V, Bitoljanu N, Cakar L, Cakar Z, Rosoklija G. Visualisation of microglia with the use of immunohistochemical double staining method for CD-68 and Iba-1 of cerebral tissue samples in cases of brain contusions. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*. 2015;36(2):141–5. DOI: 10.1515/prilozi-2015-0062.
11. Guillot A, Winkler M, Silva Afonso M, Aggarwal A, Lopez D, Berger H et al. Mapping the hepatic immune landscape identifies monocytic macrophages as key drivers of steatohepatitis and cholangiopathy progression. *Hepatology*. 2023;78(1):150–66. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000270.
12. Herd HL, Bartlett KT, Gustafson JA, McGill LD, Ghandehari H. Macrophage silica nanoparticle response is phenotypically dependent. *Biomaterials*. 2015;53:574–82. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.070.
13. Liu T, Li L, Fu C, Liu H, Chen D, Tang F. Pathological mechanisms of liver injury caused by continuous intraperitoneal injection of silica nanoparticles. *Biomaterials*. 2012;33(7):2399–407. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.008.
14. Абдрахимова Й.Р., Абдрахимов Ф.А. Биоимиджинг клеток: анализ флуоресцентных изображений митохондрий с помощью ImageJ (Часть 2): Учебно-методическое пособие. Казань: Альянс, 2019. 26 с. Доступно по адресу: [https://kpfu.ru/staff\\_files/F97244520/Abdrakhimova\\_Abdrakhimov\\_2.pdf](https://kpfu.ru/staff_files/F97244520/Abdrakhimova_Abdrakhimov_2.pdf) (получено 17.05.2023).  
*Abdrakhimova YR, Abdrakhimov FA*. Cell bioimaging: analysis of fluorescent images of mitochondria using ImageJ (Part 2): Study guide. Kazan: Alyans, 2019. 26 p. (In Russ.). Available from: [https://kpfu.ru/staff\\_files/F97244520/Abdrakhimova\\_Abdrakhimov\\_2.pdf](https://kpfu.ru/staff_files/F97244520/Abdrakhimova_Abdrakhimov_2.pdf) (accessed 17.05.2023).
15. Jensen EC. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013;296(3):378–81. DOI: 10.1002/ar.22641.
16. Smitha T, Sharada P, Girish H. Morphometry of the basal cell layer of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma using computer-aided image analysis. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011;15(1):26–33. DOI: 10.4103/0973-029X.80034.
17. Vida C, de Toda IM, Cruces J, Garrido A, Gonzalez-Sanchez M, De la Fuente M. Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biol*. 2017;12:423–37. DOI: 10.1016/j.redox.2017.03.005.
18. Kenkhuis B, Somarakis A, Kleindouwel LRT, van Roon-Mom WMC, Höllt T, van der Weerd L. Co-expression patterns of microglia markers Iba1, TMEM119 and P2RY12 in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2022;167:105684. DOI: 10.1016/j.nbd.2022.105684.



**Информация об авторах**

Евгения Александровна Григорьева – аспирантка кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Валентина Сергеевна Гордова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальной медицины медицинского института Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта.

Валентина Ефремовна Сергеева – доктор биологических наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Алина Тихоновна Смородченко – доктор медицинских наук, профессор кафедры анатомии Медицинской школы Берлина – Университета здоровья и медицины.

**Author information**

Evgeniia A. Grigoreva – Post-Graduate Student, Department of Medical Biology with a course of Microbiology and Virology, IN Ulyanov Chuvash State University.

<https://orcid.org/0000-0003-3626-2750>

Valentina S. Gordova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Fundamental Medicine of the Medical Institute, Immanuel Kant Baltic Federal University.

<https://orcid.org/0000-0001-5109-9862>

Valentina E. Sergeeva – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Medical Biology with a course of Microbiology and Virology, IN Ulyanov Chuvash State University.

<https://orcid.org/0000-0003-3471-5226>

Alina T. Smorodchenko – Dr. Sci. (Med.), Professor, Anatomy Department, Medical School Berlin – University of Health and Medicine.

<https://orcid.org/0000-0003-1415-1531>