

Duangrudee Cherdwongcharoensuk

**Changes in the Respiratory System Caused by Exposure
of Mice to Selenium or its Derivative**

Resumo

Abstract

บทคัดย่อ



**Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto**

2004



10020

RESUMO

Os efeitos nocivos nos tecidos respiratórios devidos à inalação de selênio (Se) e a um seu derivado, o dimetilSe (DMSe), foram investigados nesta tese com particular atenção às alterações morfológicas e inflamatórias causadas por estas substâncias no ratinho. A presente dissertação inclui ainda o estudo da remoção das partículas de Se pelos macrófagos alveolares e pelos granulócitos e das alterações na deposição de colagénio nos pulmões de ratinhos tratados com Se ou DMSe.

As alterações histopatológicas do epitélio traqueal e dos pulmões provocadas por uma única instilação intratraqueal de duas doses diferentes de DMSe (0.05 e 0.1 mg Se/Kg BW) foram estudadas após 1, 7, 14 e 28 dias após o tratamento. O epitélio traqueal mostrou diminuição do número de cílios e necrose aguda e, em algumas amostras, mesmo uma transformação metaplástica. Edema e lesão alveolar difusa foram observados nos pulmões. As lesões respiratórias causadas pelo Se foram correlacionadas com a dose de DMSe administrado. Em contraste com as lesões traqueais agudas, inflamação crónica assim como o aumento da espessura do septo alveolar ocorrem nos pulmões dos mesmos animais, sem evidência de recuperação das lesões 4 semanas após a instilação inicial.

O estudo da cinética dos biomarcadores inflamatórios do líquido broncoalveolar incluiu o número de leucócitos, e o doseamento de lactato desidrogenase (LDH) e das proteínas totais. A investigação foi feita com vista a caracterizar-se a resposta inflamatória dos pulmões dos animais a uma única instilação intratraqueal de DMSe. Os neutrófilos foram os leucócitos mais numerosos encontrados no período inicial da inflamação causada por DMSe. O número de macrófagos aumentou apenas moderadamente, enquanto que os linfócitos não evidenciaram aumento significativo após a instilação de Se. Verificou-se um ligeiro aumento de proteína total no exsudado alveolar e, mais

tardamente, um aumento de LDH nos animais a que foi administrada a dose mais elevada de DMSe. Esta dose de DMSe (0.1 mg Se/kg BW) causou um aumento sustentado do número de neutrófilos e macrófagos durante as 4 semanas de estudo, enquanto a dose mais baixa (0.05 mg Se/Kg) resultou numa reacção inflamatória observada apenas durante 2 semanas. Pode-se concluir que o DMSe origina uma resposta inflamatória que é dependente da dose administrada e que se reflecte em alterações do epitélio respiratório.

Os colagénios I, II e IV, foram estudados nos pulmões dos animais tratados com DMSe, verificando-se que o colagénio do tipo I sofreu um aumento em septos alveolares 7 e 14 dias após a administração de DMSe. O colagénio do tipo II sofreu apenas um aumento moderado, mas o colagénio IV não sofreu qualquer alteração durante o tratamento. Pode-se concluir que a instilação por DMSe causa um transitório aumento em colagénio I provocando a sua acumulação na parede alveolar, sem que hajam alterações do colagénio das membranas basais (tipo IV). O aumento de colagénio I foi temporário indicando que a fibrogénese pulmonar causada por uma única instilação de DMSe é um processo reversível.

A microscopia de luz e a microscopia electrónica de varrimento acoplada à microanálise elementar de raio-X (SEM-XRM) foram usadas para investigar a remoção das partículas de Se do pulmão do ratinho. Foi observado que praticamente todos os macrófagos alveolares continham partículas de Se. Apenas menos de metade dos neutrófilos mostravam ingestão de partículas de Se. Observou-se que os macrófagos alveolares com Se migram para o espaço intersticial onde são capturados 72 horas após a instilação das micropartículas. Conclui-se que a resposta inflamatória aguda do pulmão às partículas de Se é dominada pelos neutrófilos, mas que a remoção do metal é realizada maioritariamente pelos macrófagos alveolares.

Esta dissertação oferece a definição morfológica e inflamatória das alterações agudas da traqueia e do pulmão à instilação de Se ou de DMSe.

ABSTRACT

The harmful effects on respiratory tissues due to inhalation of selenium (Se) and of one of its derivatives dimethyl selenide (DMSe) were investigated in this thesis. The focus was on the morphological and inflammatory changes that were experimentally induced in mice by Se or DMSe. This effort includes the study of removal of Se particulates by alveolar macrophages and granulocytes, and the modifications in collagen deposition triggered in the lungs by Se or DMSe.

The histopathological alterations of murine tracheal epithelium and lungs caused by a single intratracheal instillation of two different doses of DMSe (0.05 and 0.1 mg Se/kg BW) were defined 1, 7, 14 and 28 days after the DMSe treatment. The tracheal epithelium showed loss of cilia and acute necrosis and, in some instances, metaplastic transformation. Edema and diffuse alveolar damage was observed in the lungs. Moreover, the respiratory lesions caused by Se were found to be dose dependent since the higher DMSe dose triggered more serious respiratory lesions than the lower one. In contrast with the transient nature of tracheal lesions, chronic inflammation and increased thickness of alveolar septa occurred in the lungs with no amelioration of lesions after 4 weeks of Se the initial instillation.

The kinetic of inflammatory biomarkers in bronchoalveolar lavage (BAL) samples, including leukocytes, lactate dehydrogenase (LDH) and total protein, were used to characterize the inflammatory response of the mouse lungs induced by a single intratracheal instillation of DMSe. Neutrophils were the most numerous leukocytes during the early inflammatory influx. Macrophages increased moderately and lymphocytes showed no increase after the Se instillation. An early increase in total protein of BAL, and late enhancement in LDH was observed in mice treated with the high DMSe dose. Furthermore, the higher dose of DMSe triggered a sustained enhancement in

the number of neutrophils and macrophages during the 4 weeks of the study, while the lower dose of DMSe resulted in an inflammation reaction that lasted only for 2 weeks. In addition, DMSe led to a dose-dependent inflammatory reaction in the mouse airways that resembles the kinetics of damage of respiratory epithelia that occurred upon DMSe inhalation.

Staining of collagen I, II and IV was investigated in the lungs of DMSe treated mice, I was found that collagen type I was enhanced in alveolar septa, at day 7. Collagen II was moderately increased but collagen IV was not significantly changed by the treatment. It can be concluded that DMSe instillation caused an increase in collagen I fibrils with no changes in basement-membrane collagen (type IV), and also that the enhancement in lung collagens was transient, indicating that lung fibrosis triggered by a single airway instillation of DMSe is a reversible event.

Light microscopy and scanning electron microscopy coupled with X-ray elemental microanalysis (SEM-XEM) were used to investigate the removal of inhaled Se particle in the mouse lung. It was documented that virtually all BAL macrophages contained Se particles of different size. Only less than half of the neutrophils showed ingested Se particles. There was evidence that the Se-loaded alveolar macrophages migrated into the interstitial space of the alveoli where they were often captured 72 hrs after inhalation of the microparticulate. The acute inflammatory response in the lung to Se particles was dominated by neutrophils but the removal of Se was done mostly by alveolar macrophages.

Taken together, the experimental data of this thesis define the early structural changes of respiratory tissues in response to the instillation of Se particles or of a Se derivative.

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้ ทำการศึกษาถึงผลกระทบอันร้ายแรงต่อเนื้อเยื่อระบบหายใจจากการสูดดมสารซิลิเนียม และอนุพันธ์ ไคเมทิล ซิลิไนต์. การทดลองนี้เน้นถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการอักเสบอันเนื่องมาจากผลของการฉีดสารซิลิเนียมหรือไคเมทิล ซิลิไนต์ในหนู. นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาถึงการเคลื่อนย้ายอนุภาคของสารซิลิเนียม โดย alveolar macrophages และ granulocytes ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนภายในปอด อันเนื่องมาจากการได้รับสารซิลิเนียมหรือไคเมทิล ซิลิไนต์.

ได้ทำการตรวจพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อหลอดคอและปอด ในวันที่ 1, 7, 14 และ 28 หลังจากการฉีดสารไคเมทิล ซิลิไนต์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 2 ระดับ คือ 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว. พบว่ามีการสูญหายของ cilia ในเนื้อเยื่อหลอดคอ, พบเซลล์ตาย และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (metaplastic transformation). สังเกตพบความผิดปกติในส่วนของเนื้อเยื่อปอด คือ มี edema และ diffuse alveolar damage. นอกจากนี้ยังพบว่าความร้ายแรงของพยาธิสภาพของระบบหายใจขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารซิลิเนียม โดยซิลิเนียมที่มีความเข้มข้นสูงจะมีผลทำลายระบบหายใจมากกว่าที่มีความเข้มข้นต่ำ. การอักเสบถาวรและการหนาตัวขึ้นของผนัง alveolar septa เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อปอดตลอด 4 สัปดาห์ หลังจากฉีดสารซิลิเนียม แต่การอักเสบของเนื้อเยื่อหลอดคอเป็นแบบไม่ถาวร.

ผลของการอักเสบของปอดเนื่องจากการได้รับสารไคเมทิล ซิลิไนต์นั้น ศึกษาได้โดยการเปลี่ยนแปลงของ inflammatory biomarkers ในตัวอย่าง bronchoalveolar lavage

(BAL) ซึ่งประกอบด้วย เม็ดเลือดขาว, lactate dehydrogenase (LDH) และ total protein. สำหรับ neutrophils นั้นพบว่าเป็นเม็ดเลือดขาวที่พบมากที่สุดของการอักเสบในระยะแรกๆ. สำหรับ macrophages พบว่ามีจำนวนมากขึ้น แต่ไม่พบการเพิ่มจำนวนของ lymphocytes หลังการฉีดสารซิติเนียม. ระดับของ LDH และ total protein ใน BAL เพิ่มขึ้น เมื่อฉีดด้วยสารโคเมทิล ซิติไนต์ที่มีความเข้มข้นสูง. นอกจากนี้สารโคเมทิล ซิติไนต์ที่มีความเข้มข้นสูงก่อให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ neutrophils และ macrophages ตลอด 4 สัปดาห์ของการศึกษา แต่สารโคเมทิล ซิติไนต์ที่มีความเข้มข้นต่ำนั้นก่อให้เกิดการอักเสบเฉพาะในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการศึกษา. การอักเสบเนื่องมาจากสารโคเมทิล ซิติไนต์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร ซึ่งตรงกันกับพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อระบบหายใจที่ความร้ายแรงนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารโคเมทิล ซิติไนต์ที่สุดคมเข้าไป.

เมื่อนำเนื้อเยื่อปอดของหนูมาย้อมสีคอลลาลาเจนชนิดที่ 1, 2 และ 4 พบว่าคอลลาลาเจนชนิดที่ 1 เป็นชนิดที่เพิ่มจำนวนใน alveolar septa โดยเฉพาะวันที่ 7. สำหรับคอลลาลาเจนชนิดที่ 2 เพิ่มจำนวนมากขึ้น แต่จำนวนของคอลลาลาเจนชนิดที่ 4 ไม่พบว่ามีเปลี่ยนแปลงหลังฉีดสาร. ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงคอลลาลาเจนของปอดหรือ lung fibrosis เนื่องจากการฉีดสารโคเมทิล ซิติไนต์เพียง 1 ครั้งเป็นแบบไม่ถาวร โดยคอลลาลาเจน ชนิดที่ 1 มีการเพิ่มจำนวน ส่วนคอลลาลาเจน ชนิดที่ 4 ใน basement-membrane ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนแต่อย่างใด.

ได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงการเคลื่อนย้ายอนุภาคของซิติเนียมในปอดของหนู ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่าง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ร่วมกับ X-ray

elemental microanalysis (SEM-XEM) พบว่าใน BAL macrophages ถูกนำมาใช้ในการสำรวจ. ซึ่งพบว่า BAL macrophages ทุกเซลล์ประกอบด้วยอนุภาคของซิลิเนียมที่มีขนาดแตกต่างกันออกไป. ส่วน neutrophils นั้นมีจำนวนน้อยกว่าครั้งที่พบอนุภาคของซิลิเนียมอยู่ในเซลล์. การพบดังกล่าวนี้บ่งบอกว่า alveolar macrophages ที่มีซิลิเนียมอยู่ใน ใต้เคลื่อนย้ายเข้าสู่ interstitial space ของ alveoli ซึ่งเป็นบริเวณที่มักพบเซลล์เหล่านี้ หลังสูดดมอนุภาค 72 ชั่วโมง. neutrophils เป็นเซลล์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบอย่างเฉียบพลันของปอดต่ออนุภาคซิลิเนียม แต่ alveolar macrophages เป็นเซลล์ที่เคลื่อนย้ายอนุภาคซิลิเนียม.

ผลการทดลองจากการศึกษานี้แสดงถึงการเริ่มแรกของการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของเนื้อเยื่อระบบหายใจ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการฉีดอนุภาคซิลิเนียมหรืออนุพันธ์ของซิลิเนียม.