

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭПИДЕРМИСА КОЖИ КРЫС
ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ
НА ЕЁ НЕПОВРЕЖДЕННУЮ ПОВЕРХНОСТЬ
НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА СВИНЦА****ГУ «Институт медицины труда НАМН Украины» (г. Киев)****lugsp61@gmail.com**

Данная работа является фрагментом комплексной научной темы, разрабатываемой в ГУ «ИМТ НАМН Украины» по программе фундаментальных исследований в области безопасности наноматериалов и нанотехнологий, № государственной регистрации 0114U002409.

Вступление. В недавно опубликованных IRGC (*International Risk Governance Council*) руководствах по управлению рисками приведены данные, свидетельствующие о значительном увеличении в последние годы потенциальных рисков, обусловленных широким внедрением в промышленность, сельское хозяйство и сферы быта нанотехнологий и наноматериалов [7].

Ничтожно малые размеры наночастиц (НЧ), а также значительная площадь их поверхности заметно увеличивают риск проникновения НЧ в живой организм разными путями, особенно через органы дыхания и ЖКТ, где средняя эффективная площадь поверхности клеток достигает 140 м² и 200 м², соответственно. Следует отметить, что в современной научной литературе неоправданно мало внимания уделяется коже. При этом кожа, являясь сложным, многофункциональным органом способна принимать активное участие не только в процессах поступления (всасывания) НЧ в организм, но также в процессах их метаболических превращений и экскреции [5]. Вместе эти вопросы, связанные с изучением особенностей реагирования кожи на воздействие НЧ, особенно представленных соединениями токсичных металлов, приобретают на современном этапе актуальное значение.

Цель исследования – изучить морфофункциональные изменения кожи крыс при хроническом воздействии на её неповрежденную поверхность НЧ свинца, представленных сульфидом свинца (PbS) с размером частиц 12,5 нм и 100 нм, соответственно.

Объект и методы исследования. Исследования проведены на 32-х половозрелых крысах-самцах линии «Вистар» с исходной массой 120-130 г, которые содержались в стационарных условиях вивария в соответствии с рекомендациями [2]. Все манипуляции с животными проводили с соблюдением основных этических требований, изложенных в [4,6]. Животные были разделены на 4 группы, из них

3-и опытных и 1-а контрольная. В эксперименте использовали коллоиды НЧ PbS, размером 12,5 нм и 100 нм, стабилизированные 1% желатином, которые были синтезированы в Институте физической химии имени Л.В. Писаржевского НАНУ. Кроме того использовали водный раствор ацетата свинца (АС) с размером частиц 600-700 нм. В ходе эксперимента крысам на предварительно выстриженную поверхность кожи спины, площадью 2 см² ежедневно, 5 дней в неделю в течение 3-х месяцев на 4 часа наносили 1,0 мл коллоидов, соответственно: НЧ PbS размером 12,5 нм (I группа); НЧ PbS размером 100 нм (II группа); АС (III группа), а также 0,05% раствора желатина (контроль). Во всех случаях концентрация Pb в растворах была 0,01 г/л, а концентрация НЧ PbS размером 12,5 нм, наносимых на 1 см² кожи составляла 1,9 · 10¹⁴ частиц; размером 100 нм – 0,62 · 10¹² частиц, а АС – 1,58 · 10⁹ частиц, соответственно. По окончании опыта крыс наркотизировали нимбуталом (20 мг/кг) и декапитировали. Вырезанные кусочки кожи, размером 10 x 5 мм фиксировали в растворе Лили и Карнуа не более 72 часов и подвергали стандартной процедуре заливки в парафин [6]. Парафиновые срезы, толщиной 7–10 мкм, приготовленные с помощью микротомы, окрашивали гематоксилином-эозином, толуидиновым синим, по методу Бреше, Слинченко, альдегид-фуксин Гомори, Picro Sirius Red – Fast Green SFC, а также проводили реакцию сульфид–серебро для обнаружения соединений Pb [6]. Гистологические исследования проводили с помощью светового микроскопа *Olimpus BX 54*, оснащенного поляризационными фильтрами. Обнаруженные изменения документировали с помощью фотокамеры *Olimpus C-5050 ZOOM* с программным обеспечением *Olimpus DP-Soft*. Морфометрические исследования проводили в соответствии с рекомендациями Г.Г. Автандилова [3]. При этом измеряли всю толщину эпидермиса (ТЭ) и отдельных его слоев: рогового (РС), зернистого (ЗС) и базального (БС), кроме того измеряли большой и малый диаметры базальных кератиноцитов (БК) по которым определяли объем этих клеток (ОБК).

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с помощью программного продукта *STATISTICA*

МОРФОЛОГІЯ

6.0 Stat Soft Inc. Полученные данные выражали минимальными и максимальными значениями (*min-max*) показателей, их медианой (*Me*) и межквартильными интервалами ($Q_{25\%}; Q_{75\%}$). Для проверки статистических гипотез использовали критерий Уилкоксона-Манна-Уитни (*U*) при уровне значимости $\alpha = 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Гистологические исследования показали, что длительное воздействие на неповрежденную кожу крыс АС характеризовалось выраженной атрофией эпидермиса, которое было обусловлено значимым ($p_u < 0,05$) по сравнению с контролем истончением рогового слоя (**табл.**), которое было обусловлено чрезмерным слущиванием клеток рогового слоя с поверхности эпидермиса (**рис. 1. а, б**). При этом данные морфометрии не выявили значимой разницы по сравнению с контролем значений показателей толщина зернистого и базального слоя, в то время, как толщина базального слоя эпидермиса после воздействия АС значимо ($p_u < 0,05$) уменьша-

лась (**табл.**). В базальном слое эпидермиса при этом обнаруживали значимое ($p_u < 0,05$) по сравнению с контролем уменьшение объема базальных кератиноцитов (**табл.**), отмечая при этом заметное уменьшение в базальном слое эпидермиса количества фигур митоза.

Длительное воздействие на кожу НЧ PbS размером 12,5 нм аналогично воздействию АС сопровождалось развитием выраженной атрофии эпидермиса, толщина которого по данным морфометрии (**табл.**) значимо ($p_u < 0,05$) отличалась от контроля. Вместе с этим значимое по сравнению с контролем истончение рогового слоя эпидермиса ($p_u < 0,05$) сопровождалось выраженной дистрофией кератиноцитов в виде значительного уплощения их формы, заметного утолщения клеточной оболочки с участками позитивной анизотропии, а также их выраженной базофилии (**рис 1. в**), обусловленной накоплением кислых белков, которые обнаруживались по их интенсивно-красному окрашиванию методом Слинченко (**рис. 2. а, б**). При этом в эпидермисе

Таблица.

Морфометрические изменения эпидермиса кожи крыс при хроническом воздействии АС и НЧ PbS размером 12,5 нм и 100 нм.

Группы и показатели							
Контроль		I Группа		II Группа		III Группа	
$\frac{\text{min}}{\text{max}}$	$\frac{\text{Me}}{Q_{25} - Q_{75}}$	$\frac{\text{min}}{\text{max}}$	$\frac{\text{Me}}{Q_{25} - Q_{75}}$	$\frac{\text{min}}{\text{max}}$	$\frac{\text{Me}}{Q_{25} - Q_{75}}$	$\frac{\text{min}}{\text{max}}$	$\frac{\text{Me}}{Q_{25} - Q_{75}}$
Толщина эпидермиса. мкм							
$\frac{35,0}{104,37}$	$\frac{64,6}{44,7 - 83,3}$	$\frac{16,3}{51,0}$	$\frac{30,8^*}{25,9 - 37,4}$	$\frac{9,2}{57,2}$	$\frac{24,2^*}{21,8 - 33,2}$	$\frac{10,0}{106,}$	$\frac{44,0^{*\mp}}{30,9 - 55,2}$
Толщина рогового слоя эпидермиса. мкм							
$\frac{0,2}{69,3}$	$\frac{24,0}{17,8 - 28,2}$	$\frac{0,2}{18,0}$	$\frac{4,0^*}{2,2 - 6,8}$	$\frac{0,2}{28,6}$	$\frac{0,4^{*\mp}}{0,1 - 0,9}$	$\frac{0,2}{29,0}$	$\frac{7,9^{*\mp}}{6,15 - 15,7}$
Толщина зернистого слоя эпидермиса, мкм							
$\frac{6,8}{16,9}$	$\frac{9,7}{8,6 - 12,7}$	$\frac{4,0}{19,4}$	$\frac{7,7}{6,0 - 11,1}$	$\frac{2,6}{17,6}$	$\frac{7,0^*}{5,3 - 8,6}$	$\frac{0,2}{24,2}$	$\frac{11,2^\circ}{6,4 - 13,5}$
Толщина базального слоя эпидермиса. мкм							
$\frac{7,9}{16,3}$	$\frac{13,4}{11,0 - 13,6}$	$\frac{4,4}{13,2}$	$\frac{9,2}{8,5 - 11,3}$	$\frac{2,2}{12,1}$	$\frac{9,5^*}{7,9 - 11,0}$	$\frac{6,2}{35,2}$	$\frac{13,2^{\mp\circ}}{10,6 - 19,2}$
Объем базальных кератиноцитов, мкм ³							
$\frac{16,8}{757,0}$	$\frac{144,3}{70,5 - 367,3}$	$\frac{10,8}{285,1}$	$\frac{40,2^*}{18,9 - 72,5}$	$\frac{6,2}{321,6}$	$\frac{55,7^{*\mp}}{19,3 - 107,1}$	$\frac{1,4}{451,8}$	$\frac{89,8^{*\mp}}{42,8 - 162,9}$

Примечание. Различия статистически значимы при $\alpha = 0,05$ по сравнению: * – с контролем; \mp – группой I; \circ – группой II.

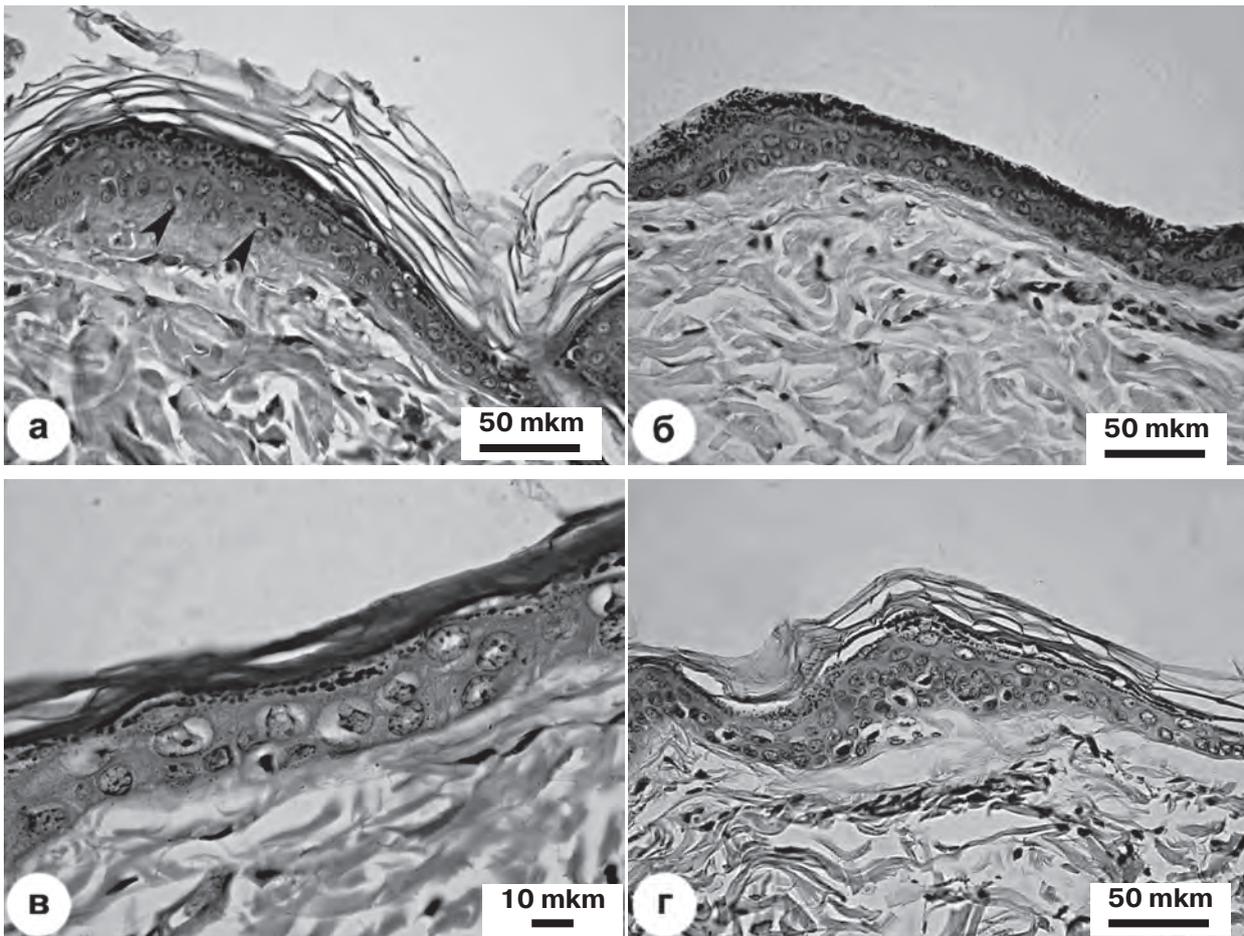


Рис. 1. Гистологические изменения в коже крыс контрольной группы (а), а также после 3-х месяцев воздействия ацетата свинца (б) и НЧ PbS размером 12,5 нм. (в), а также 100 нм. Окраска гематоксилин – эозин. Стрелками указаны фигуры митозов в базальном слое эпидермиса.

кожи крыс отмечали значимое по сравнению с контролем ($p_v < 0,05$) уменьшение толщины рогового и базального слоя эпидермиса (**табл.**), которое сопровождалось аналогичным уменьшением объема базальных кератиноцитов (**табл.**), а также уменьшением количества выявляемых митозов.

При длительном воздействии на кожу крыс НЧ PbS размером 100 нм атрофический, по сравнению с контролем характер изменений эпидермиса заметно отличался от воздействий АС и НЧ PbS размером 12,5 нм (**табл.**). Если при действии НЧ PbS размером 100 нм отмечалось значимое ($p_v < 0,05$) по сравнению с контролем уменьшение его толщины (**табл.**), то по сравнению с аналогичным действием на кожу крыс АС и НЧ PbS размером 12,5 нм, толщина эпидермиса значимо ($p_v < 0,05$) возрасла (**табл.**). Эти изменения сопровождались аналогичным, значимым ($p_v < 0,05$) увеличением толщины как рогового, так и базального слоя эпидермиса, а по сравнению с действием НЧ PbS размером 12,5 нм еще и значимым ($p_v < 0,05$) увеличением толщины зернистого слоя (**табл.**). При этом в роговом слое эпидермиса отмечали выраженный отек корнеоцитов и расширение межклеточных пространств (**рис. 1. г**), позитивной анизотропии в мембранах конеоцитов (**рис. 2. в**),

а также наличие плотных, кристаллоподобных включений PbS, представленных крупными агломератами НЧ, выявляемые с помощью реакции сульфид-серебро (**рис. 2. г**).

Выводы

Результаты проведенных исследований показали, что хроническое воздействие ацетата свинца с размером частиц 700 нм, а также НЧ PbS размером 12,5 нм и 100 нм на неповрежденную кожу крыс сопровождается морфологическими изменениями эпидермиса, которые с одной стороны характеризуют процесс его повреждения, а с другой – развитие структурных перестроек, направленных на поддержание тканевого гомеостаза в условиях снижения его надежности. При этом показано, что НЧ PbS способны приобретать новые, не характерные для микрочастиц Pb свойства, определяющие особенности их взаимодействия с эпидермисом кожи. Это может быть связано с высокой удельной площадью поверхности НЧ, определяющей увеличение химической реактивности соединений свинца.

Перспективы дальнейших исследований

Планируется изучение особенности ультраструктурных изменений эпидермиса кожи крыс при длительном воздействии НЧ PbS в зависимости от их размера.

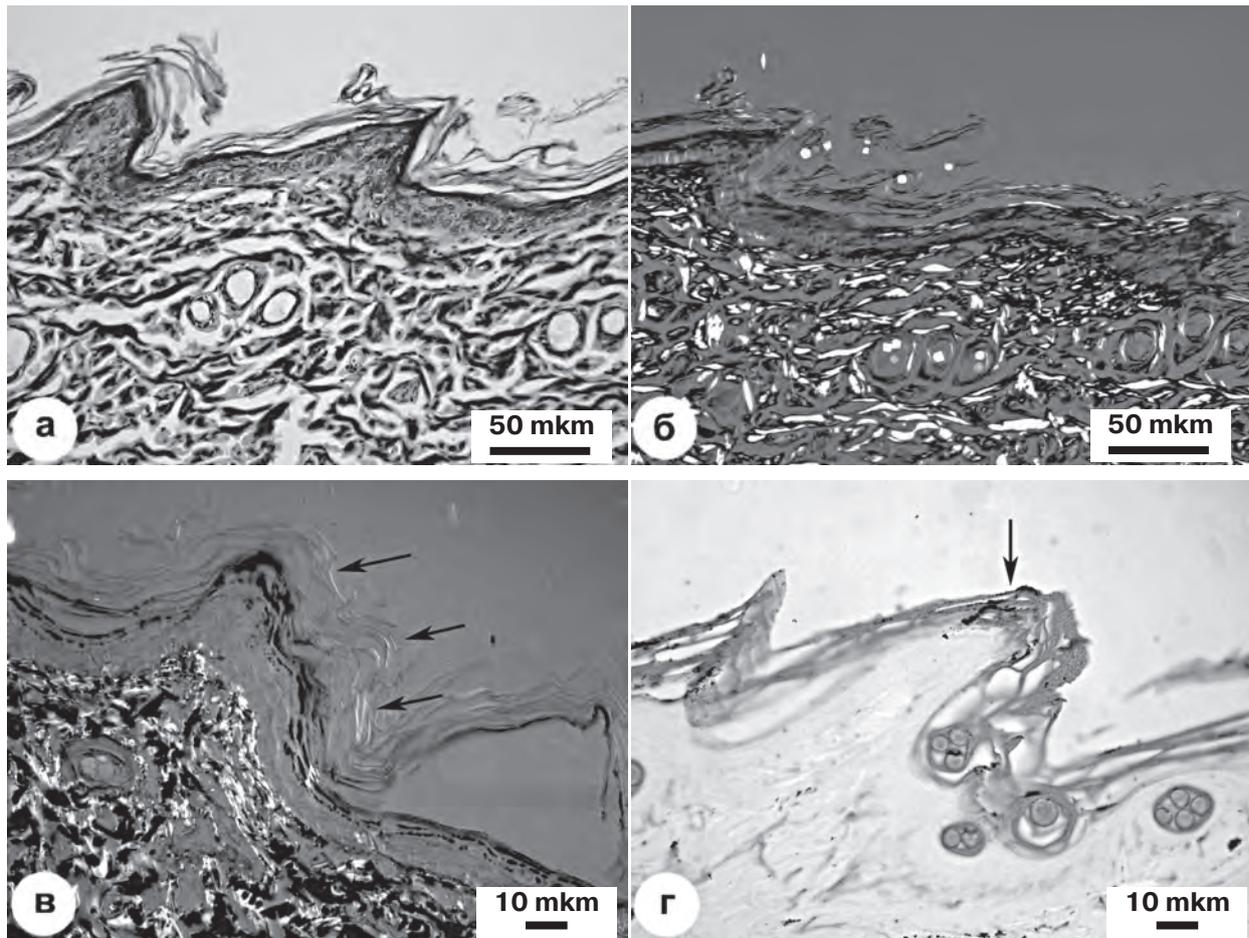


Рис. 2. Гистохимические изменения в коже крыс через 3- и 100 нм после воздействия НЧ PbS размером 12,5 нм. (а, б) и 100 нм (в, г). Метод Слинченко (а, б); Picro Sirius Red – Fast Green SFC (в); реакция сульфид-серебро с докраской толуидиновым синим (г). Световая (а, г) и поляризационная (б, в) микроскопия. Указано стрелками: а) – позитивная анизотропная реакция корнеоцитов в роговом слое эпидермиса; б) – образование сульфида серебра в местах локализации агломератов НЧ PbS.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Кожем'якін Ю.М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко [та ін.]. – К.: Авіцена, 2002. – 156 с.
3. Микроскопическая техника: руководство / под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
4. Общие этические принципы экспериментов на животных (мат. I Национального конгресса по биоэтике). – К.: НАНУ, 2001. – 16 с.
5. Dermal absorption of nanomaterials. Part of the «Better control of nano», initiative 2012-2015 (Environmental Project No. 1504, 2013) / С.А. Poland, S.A.K. Read, J. Varet [et al.] // Danish Environmental Protection Agency. – Copenhagen, 2013. – 167 p.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experiment and other scientific purposes / Coun. of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.
7. Nanotechnology Risk Governance Recommendations for a global, coordinated approach to the governance of potential risks [Electronic resource] / International Risk Governance Council. – Geneva, 2007. Mode of access: http://www.irgc.org/IMG/pdf/PB_nanoFINAL2_2_.pdf.

УДК 546.815'221.1-168:616.591:57.084

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ЕПІДЕРМІСУ ШКІРИ ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛІЙ ДІЇ НА ЇЇ НЕПОШКОДЖЕНУ ПОВЕРХНЮ НАНОЧАСТИНОК СУЛЬФІДУ СВИНЦЮ

Мельник Н. А., Луговський С. П., Діденко М. М.

Резюме. В статті наведені дані експериментальних досліджень, проведених на щурах метою яких було вивчення морфофункціональних змін епідермісу шкіри щурів при хронічному впливі на її непошкоджену поверхню НЧ PbS розміром 12,5 нм і 100 нм в порівнянні з дією ацетату свинцю (АС) з розміром частинок 700 нм. Результати проведених досліджень показали, що дія АС, а також НЧ PbS 12,5 нм і 100 нм супро-

воджується морфологічними змінами епідермісу шкіри, які з одного боку характеризують процес її пошкодження, а з іншого розвиток структурних перебудов, направлених на підтримку тканинного гомеостазу в умовах зниження його надійності. При цьому показано, що НЧ PbS здатні набувати нових, не характерних для мікрочастинок Pb властивостей, які визначають особливості взаємодії наночастинок з клітинними та тканинними структурами епідермісу, що може бути пов'язано зі збільшенням питомої поверхні НЧ, що сприяє значному збільшенню хімічної активності неорганічних сполук свинцю.

Ключові слова: шкіра щурів, епідерміс, гістологічні зміни, наночастинки PbS.

УДК 546.815'221.1-168:616.591:57.084

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭПИДЕРМИСА КОЖИ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ЕЁ НЕПОВРЕЖДЕННУЮ ПОВЕРХНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА СВИНЦА

Мельник Н. А., Луговской С. П., Диденко М. Н.

Резюме. В статье приведены данные экспериментальных исследований, проведенных на крысах целью которых было изучение морфофункциональных изменений эпидермиса кожи крыс при хроническом воздействии на её неповрежденную поверхность НЧ PbS размером 12,5 нм и 100 нм по сравнению с действием ацетата свинца (АС) с размером частиц 700 нм. Результаты проведенных исследований показали, что действие АС, а также НЧ PbS 12,5 нм и 100 нм сопровождается морфологическими изменениями эпидермиса кожи, которые с одной стороны характеризуют процесс его повреждения, а с другой – развитие структурных перестроек, направленных на поддержание тканевого гомеостазу в условиях снижения его надежности. При этом показано, что НЧ PbS способны приобретать новые, не характерные для микрочастиц Pb свойства, которые определяют особенности взаимодействия НЧ с клеточными и тканевыми структурами эпидермиса, что может быть связано с увеличением удельной площади поверхности НЧ, способствующей значительному увеличению химической активности неорганических соединений свинца.

Ключевые слова: кожа крыс, эпидермис, гистологические изменения, наночастицы PbS.

UDC 546.815'221.1-168:616.591:57.084

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE SKIN EPIDERMIS OF RATS UNDER A LONG-TERM EFFECT OF LEAD SULFIDE NANOPARTICLES ON THE UNDAMAGED SURFACE

Melnik N. A., Lugovskoi S. P., Didenko M. N.

Abstract. The purpose of the work was to study morphofunctional changes in the skin epidermis of rats under chronic effect of PbS nanoparticles (NP) of 12,5nm and 100nm size on the undamaged skin.

The experiments were conducted on 4 groups of "Vistar" rats» (32 rats in total, 8 rats in each group), whom colloids of PbS NP, sized 12,5, in the concentration of $1,9 \cdot 10^{14}$ NP/cm²; PbS NP of 100 nm in the concentration of $0,62 \cdot 10^{12}$ NP/cm²; lead acetate (LA), sized 700 nm in the concentration of $1,58 \cdot 10^9$ NP/cm², as well as 0,5ml/cm² solution of a stabilizer (0,1% gelatin) were applied on the undamaged skin daily, within 3 months. In this, the concentration of Pb in solutions in all cases was 0,01 g/l. Morphological investigations were conducted by studying histological sections, stained with hematoxylin-eosin, toluidine blue, using a light microscope, by a method of Brashe, Slinchenko and Gomori (aldehyde fuchin) and, also, after using a sulfide-silver reaction. Using a morphometric method there have been investigated the epidermis thickness (ET) and its layers: corneal layer (CL); granular layer (GL); basal layer (BL) and a volume of basal keratinocytes (BK). The obtained results were treated by a method of nonparametric statistics with *U*-criterion and $\alpha=0,05$ significant level.

The studies showed that the effect of LA resulted in epidermis atrophy, where its thickness, in comparison with the control, significantly decreased ($p_u < 0,05$) mainly, due to, thinning of the CL, as a result of dystrophy and peeling of corneocytes. In this, a significant decrease in the volume of the epidermis BL was marked in comparison with the control ($p_u < 0,05$) and decrease in the number of mitoses. The effect of PbS NP of 12,5 nm was accompanied by the atrophy of the epidermis, similar to the effect of LA, in comparison with the control ($p_u < 0,05$) as a result of thinning of the CL and the BL in the epidermis. In the effect of PbS NP of 100 nm atrophic changes, in comparison with the control, were characterized by its significantly larger ($p_u < 0,05$) thickness than in the effect of the LA and PbS NP of 12,5 nm, provided by statistically significant ($p_u < 0,05$) increase in all layers of the epidermis. The effect of PbS NP of 100 nm was accompanied by the edema in the CL corneocytes, widening their intercellular spaces, availability of a positive anisotropic reaction in their cellular membranes as well as availability of hard agglomerates of PbS NP on the surface and in the thickness of the CL of the epidermis, which were detected by the sulfide-silver reaction.

So, the effect of the LA and PbS NP of 12,5 nm and 100 nm was accompanied by morphological changes in the epidermis in the skin of rats, which, on one part, characterized the process of its damaging, on the other part – development of structural changes, necessary for maintaining the integrity of the tissue homeostasis in conditions of the decrease of its reliability. It this, it is seen, that PbS NP are able to acquire new properties, not characteristic for Pb microparticles, which specify peculiarities of their interaction with cellular and tissue structures of the epidermis in the skin of experimental rats.

Keywords: rat's skin, epidermis, histological changes, nanoparticles of PbS.

Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.

Стаття надійшла 06.03.2016 року