

УДК 615.27:577.125]:615.916'1:546.57

## МОРФОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ АЛЬФА-ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ ЗА УМОВ ПІДГОСТРОГО ВПЛИВУ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ДЕКАЕДРИЧНОЇ ФОРМИ

**Андрійчук Н. Й.**

*Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці; nadin\_ua@mail.ru*

В роботі досліджено можливі протекторні властивості альфа-ліпоєвої кислоти (АЛК) в дозах 12,5 та 25 мг/кг на лабораторних щурах за умов введення розчину декаедричних наночастинок срібла (НЧС) розміром 45 нм у дозі 5 мг/кг. АЛК та розчин НЧС вводили 1 раз на добу протягом 14 днів внутрішньоочеревинно. Протекторну дію ліпоєвої кислоти виявлено за допомогою морфометричного аналізу патоморфологічних змін внутрішніх органів експериментальних щурів. Профілактичне застосування АЛК за внутрішньоочеревинного введення у дозах 12,5 та 25 мг/кг призводить до зменшення інтенсивності пошкодження печінки, нирок, серця, легень та головного мозку НЧС декаедричної форми в 2-2,5 рази. Проведена оцінка протекторного впливу АЛК вказує на можливість застосування даного препарату за дози 12,5 мг/кг з метою профілактики шкідливого впливу НЧС декаедричної форми.

**Ключові слова:** наночастинок срібла, альфа-ліпоєва кислота, профілактика, морфометричний аналіз, дозозалежність.

### Вступ

Срібло є одним із найпоширеніших досліджуваних металів у нанорозмірному діапазоні. В науковій літературі описані дослідження гострої, підгострої та субхронічної токсичності наносрібла сферичної форми різних розмірів, введеного щурам внутрішньошлунково, внутрішньоочеревинно, трансдермально та інгаляційно [1]. Так, за допомогою гістопатологічних досліджень виявлено зміни у внутрішніх органах щурів, а саме у тканині печінки, нирок, легень, сім'яників та міокарду під впливом наночастинок срібла (НЧС) сферичної форми [12, 14]. Ці зміни пов'язують із залежною від розміру, дози, та статі кумуляції наносрібла в тканинах внутрішніх органів [9, 13, 15, 16, 17]. Але в даних дослідженнях відсутня інформація, щодо кількісної оцінки патоморфологічних змін, які виникають у внутрішніх органах, як результат шкідливої дії наносрібла. Морфометричний аналіз, як один з різновидів кількісної стандартизованої морфології, займає особливе місце в тосико-гігієнічних дослідженнях і дозволяє усунути цей недолік [8]. Морфометрія знаходить широке застосування в моделюванні процесів роз-

витку передпатологічних станів і патології за умов дії конкретних токсичних факторів, оцінці специфічності їх дії, що дозволяє кількісно оцінити біоефекти, прогнозувати віддалені наслідки для конкретних досліджуваних біосистем і всього організму в цілому [7].

Попередньо проведені нами патоморфологічні дослідження свідчать про розвиток дозозалежного оборотного набухання епітелію звивистих каналців нирок, гепатоцитів, ядер кардіоміоцитів, альтерації епітелію бронхів різного калібру, повнокров'я кровоносних судин у стінках респіраторних відділів легень, каріопікнозу в нейронах кіркової речовини мозку щурів, які зазнали підгострої дії срібних нанодіадрів [2]. Морфометричний аналіз дозволив виявити інтенсивність цих змін, яка зростає в ряду: легені, нирки, печінка, серце, головний мозок.

Серед стандартних засобів профілактики та лікування металотоксикозів особливе місце займають комплексопи, які сприяють виведенню металів з організму та запобігають їхньому накопиченню. Оскільки важкі метали є тіоловими отрутами, то при інтоксикаціях ними високі

детоксикуючі ефекти відмічені для препаратів, які містять активні сульфгідрильні групи. Також, важкі метали володіють про-оксидантними властивостями й хронічна їх дія призводить до постійного зростання рівня вільних радикалів та виснаження антиоксидантної системи, різкого зменшення вітамінів-антиоксидантів, тому з метою профілактики отруєнь важкими металами успішно застосовуються антиоксиданти [6].

Відомо, що альфа-ліпоева кислота (АЛК) проявляє антиоксидантну активність, володіє детоксикаційною дією, являється комплексом, сприяючи виведенню з організму солей важких металів — таких, як свинець, ртуть, миш'як, мідь та ін. [10, 11].

З літературних джерел відомі позитивні результати застосування АЛК при отруєннях важкими металами [5], проте протекторні властивості препарату за умов їх впливу при отруєннях наносріблом не досліджувались.

**Метою дослідження** було вивчення можливих протекторних властивостей даного засобу за умов під гострого впливу НЧС декаедричної форми.

#### **Матеріал і методи дослідження**

У роботі використовували зразки розчинів НЧС декаедричної форми, синтезовані методом фотостимульованого відновлення. Досліджувані об'єкти виготовлені співробітниками кафедри неорганічної хімії Чернівецького національного університету імені Ю. Федьковича. Наносрібло отримували шляхом хімічного відновлення іонів Ag<sup>+</sup> натрій боргідридом у присутності натрію цитрату та полівінілпіролідону, далі здійснювали фотохімічний вплив матрицею світлодіодів з довжиною хвилі 470 нм. Дослідження просвічувальної електронної мікроскопії показали, що отримані наноматеріали мають структуру пласких декаедрів з поперечним діаметром близько 45 нм та висотою 30-40 нм. В якості стабілізатора використовували полівінілпіролідон [4].

Досліди проводили на 5 групах (по 8

тварин в кожній) лабораторних щурів самців віком 3 міс з дотриманням вимог біоетики, відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2011), які узгоджені з положенням Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з дослідницькими та іншими цілями (Страсбург, 1986). Перша група – біологічний контроль. Другій групі вводили розчин НЧС декаедричної форми розміром 45 нм у дозі 5 мг/кг. На третій та четвертій групах тварин з'ясовували вплив двох різних доз 12,5 та 25 мг/кг альфа-ліпоевої кислоти за умов введення розчину декаедричних НЧС у дозі 5 мг/кг. Альфа-ліпоеву кислоту та розчин НЧС вводили протягом 14 днів внутрішньоочеревинно. Евтаназія тварин здійснювалася згідно з діючими рекомендаціями та етичними стандартами у стані глибокого наркозу згідно до закону України № 3447-1 від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Дозу обирали відповідно до описаних в літературі досліджень. Так, для профілактики отруєння свинцем застосовували АЛК у дозі 25 мг/кг шляхом внутрішньоочеревинного введення та інтоксикації ртуттю у дозі 10 мг/кг [10]. Крім цього, берлітрон, у дозі 10-30 мг/кг входить до складу антидотної та інтенсивної терапії при гострих отруєннях важкими металами [3].

Для світлооптичного дослідження при гістологічному дослідженні біоптати тканин серця, нирки, печінки, легень, головного мозку фіксували у 10 % нейтральному формаліні. Парафінові зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином.

#### **Результати дослідження та їх обговорення**

Патоморфологічне дослідження дозволило виявити дистрофічні зміни у кірковій речовині нирок тварин за введення НЧС. Негативний вплив НЧС на ниркову тканину характеризувався оборотнім набуханням епітелію звивистих каналців (рис. 1). При дослідженні препаратів нирки щурів, яким вводили АЛК, за умов підгострого впливу НЧС декаедричної

Таблиця 1

Кількісна патоморфологічна оцінка змін у внутрішніх органах щурів за умов підгострого впливу НЧС декаедричної форми та АЛК, %

Доза НЧС та АЛК, мг/кг	Нирки <sup>1</sup>	Печінка <sup>2</sup>	Серце <sup>3</sup>	Легені <sup>4</sup>	Легені <sup>5</sup>	Головний мозок <sup>6</sup>
5	90,0 ± 1,3	63,0 ± 2,6	16,0 ± 1,1	96,0 ± 0,9	80,0 ± 3,6	17,0 ± 1,8
АЛК 12,5 + НЧС	54,0 ± 0,9	28,0 ± 1,4	6,0 ± 0,2	41,0 ± 0,8	32,0 ± 3,7	5,0 ± 0,9
АЛК 25 + НЧС	45 ± 0,7	27,0 ± 1,4	6,0 ± 0,8	41,0 ± 0,8	30,0 ± 2,8	4,0 ± 0,7

Примітки:

1. Поширеність оборотного набухання епітелію звивистих каналців нирок, %
2. Поширеність оборотного набухання гепатоцитів, %
3. Поширеність набухання ядер кардіоміоцитів, %
4. Поширеність альтерації епітелію бронхів різного калібру, %
5. Поширеність повнокров'я кровоносних судин у стінках респіраторних відділів легень, %
6. Поширеність каріопікнозу в нейронах кіркової речовини, %

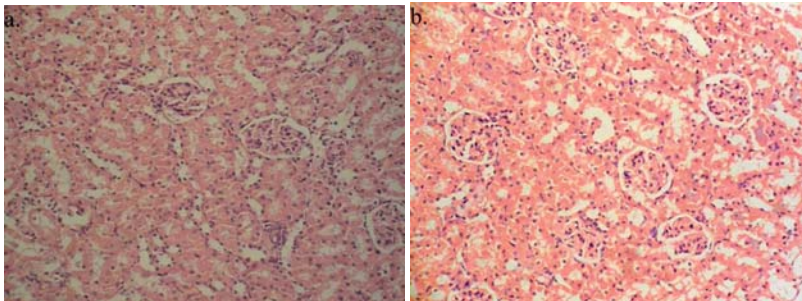


Рис. 1. Нирка щура за введення НЧС (а.) та АЛК (б.). Мікрофотографія. Забарвлення гематоксилином і еозином. Об.20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

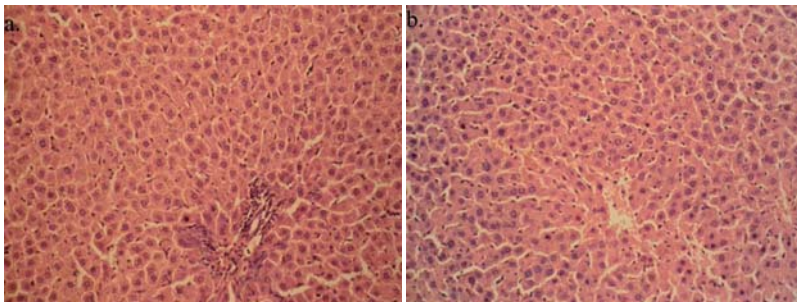


Рис. 2. Печінка щура за введення НЧС (а.) та АЛК (б.). Мікрофотографія. Забарвлення гематоксилином і еозином. Об.20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

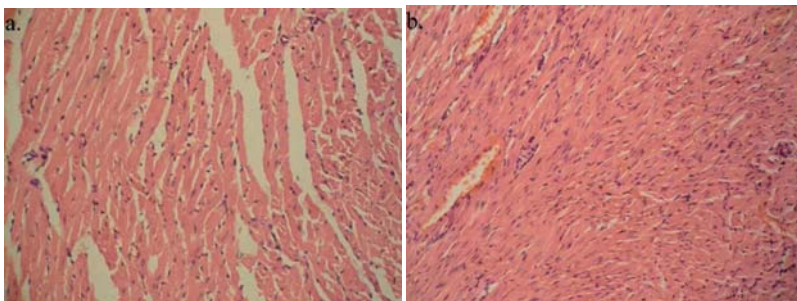


Рис. 3. Серце щура за введення НЧС (а.) та АЛК (б.). Мікрофотографія. Забарвлення гематоксилином і еозином. Об.20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

форми спостерігали зменшення поширеності оборотного набухання епітелію звивистих каналців на 40-50 % (табл. 1).

Дослідження тканини печінки щурів

уражених НЧС також вказує на пошкодження органу. Так, було виявлено оборотне набухання гепатоцитів, в основному у вигляді гідропічного набухання, інтенсивне злушення ендотелію з денудацією поверхні кровоносних судин у портальних трактах та центральних венах. У 5 ± 0,9 % гепатоцитів відмічалися явища каріопікнозу, як прояву некротичних змін цих клітин. У результаті введення АЛК на фоні впливу НЧС поширеність оборотного набухання гепатоцитів зменшилася на 54 %. При дослідженні препаратів печінки піддослідних тварин було виявлено значне зменшення інтенсивності злушення ендотелію та денудації поверхні кровоносних судин в портальних трактах та центральних венах (рис. 2).

Негативний вплив розчину НЧС декаедричної форми на міокард було виявлено при патогістологічному дослідженні серця. Зміни проявлялися у набуханні ядер кардіоміоцитів та інтенсивному злущенню ендотелію з денудацією поверхні кровоносних судин міокарда. Патогістологічне дослідження зразків органу щурів, яким вводили АЛК та НЧС декаедричної форми вказувало на зменшення набухання ядер кардіоміоцитів в міокарді на 63 % та виражене зменшення інтенсивності злушення ендотелію і денудацію поверхні кровоносних судин міокарда (рис. 3).

При забарвленні гематоксилином і еозином зразків легень піддослідних тварин відмічена альтерація епітелію бронхів різно-

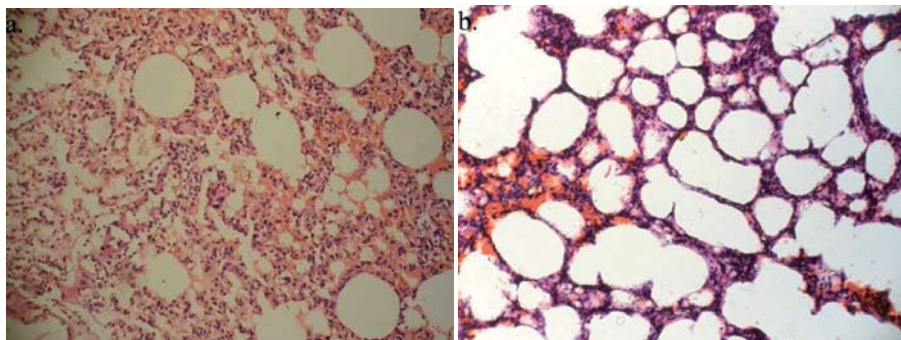


Рис. 4. Легені щура за введення НЧС (а.) та АЛК (б). Мікрофотографія. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

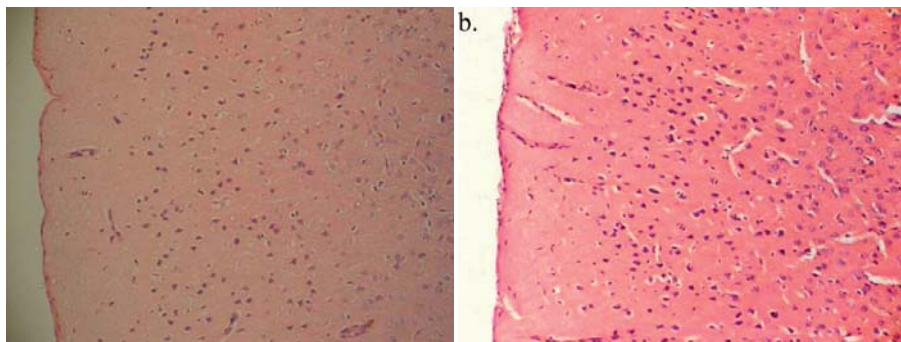


Рис. 5. Головний мозок щура за введення НЧС (а.) та АЛК (б). Мікрофотографія. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

го калібру у вигляді дистрофії або некрозу, в стінках респіраторних відділів легень відмічалось виражене повнокров'я кровосних судин у результаті підгострого впливу НЧС. За умов введення АЛК та НЧС при дослідженні препаратів легень щурів виявлено зменшення поширеності альтерації епітелію бронхів різного калібру та поширеності повнокров'я кровосних судин на 57 та 64 % відповідно (рис. 4).

Токсична дія НЧС була виявлена і при патогістологічному дослідженні головного мозку тварин. Так, у щурів спостерігався виражений спазм артеріол з розвитком періартеріолярного набряку. Крім цього, у нейронах кіркової речовини відмічали каріопікноз. Застосування АЛК призвело до зменшення поширення каріопікнозу в нейронах кіркової речовини на 69 % та зменшення значного періартеріолярного набряку у тканинах головного мозку піддослідних тварин (рис. 1.5).

#### Висновки

1. Протекторну дію ліпоєвої кислоти виявлено за допомогою морфометричного аналізу патоморфологічних змін внутрішніх органів експерименталь-

них щурів, які зазнали підгострого впливу НЧС.

2. Профілактичне застосування АЛК за внутрішньоочеревинного введення у дозах 12,5 та 25 мг/кг призводить до зменшення інтенсивності пошкодження печінки, нирок, серця, легень та головного мозку, за умов підгострого впливу НЧС декаедричної форми в 2-2,5 рази.

3. Проведена оцінка протекторного впливу АЛК вказує на можливість за-

тосування даного препарату за дози 12,5 мг/кг з метою профілактики шкідливого впливу НЧС декаедричної форми.

#### Література

1. Бойчук Т.М. До проблеми оцінки токсичності наночастинок срібла / Т. М. Бойчук, Н. Й. Андрійчук, Л. І. Власик // Клін. та експерим. патол. – 2012. – Т.ХІ, №4(42). – С. 151-158.
2. Власик Л.І. Особливості патоморфологічних змін у внутрішніх органах щурів унаслідок підгострого впливу срібних нанодекатрирів / Л.І. Власик, Н.Й. Андрійчук, І.С. Давиденко // Клінічна та експериментальна патологія. – 2014. – Т.ХІІІ, №3(49). – С. 33-36.
3. Гострі отруєння важкими металами: антидоти та інтенсивна терапія./ Коновчук В. М., Власик, Л. І., Акентьев, С. О. [та ін.]// Медицина неотложных состояний. – 2014. – № 2. – С. 79-82.
4. Іліка А.І. Фотостимульоване відновлення йонів Аргентуму з утворенням декаедричних наночастинок / А. І. Іліка, І. А.Чікірка, Ю. Б.Халавка // Науковий вісник Чернівецького університету. — 2011. – Вип. 555.: Хімія. – С. 40-43.
5. Калінін І. В. Антиоксидантна система щурів за умов інтоксикації важкими ме-

- талами та при застосуванні а-ліпоєвої і фолієвої кислот / І. В. Калінін, Н. М. Данченко, Б. О. Цудзевич // Проблеми харчування. – 2013. — №1. — С. 55-58.
6. Сучасні підходи щодо профілактики інтоксикацій важкими металами/ Трахтенберг, І. М., Дмитруха, Н. М., Козлов, К. П. [та ін.] // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – № 1 (57). – С. 253-257.
  7. Прогнозирование токсичности и опасности химических соединений / Г.А. Степансий, А.И. Корбакова и т.д. // Сборник научных трудов. – Москва, 1987. – 120 с.
  8. Трахтенберг И. М. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей / И. М. Трахтенберг, Л. А. Тимофеевская, И. Я. Квятковская //Рига: Зинатне. – 1987. – 181с.
  9. In vivo Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure / J. S. Kim, J. H. Sung, J. H. Ji / Safety and Health at Work. – 2011. – Vol. 2. – P. 34-38.
  10. Lyn P. Mercury Toxicity and Antioxidants: Part I: Role of Glutathione and alpha-Lipoic Acid in the Treatment of Mercury Toxicity / P. Lyn // Alternative Medicine Review. — 2002. – Vol.7 (13). – P. 456-471.
  11. Moini H. Antioxidant and prooxidant activities of б-lipoic acid and dihydrolipoic acid / H. Moini, L. Packer, N. E. L. Saris // Toxicology and applied pharmacology. – 2002. – Vol. 182, №. 1. – P. 84-90.
  12. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles / J. H. Jung, J. H. Ji, J. D. Park [et al.] // Toxicological Science. – 2009. – Vol. 108 (2). – P. 452-461.
  13. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles / Y. S. Kim, M. Y. Song, J. D. Park [et al.] // Particle and Fibre Toxicology. – 2010. – Vol. 7 (20). – P. 1-12.
  14. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes / D. P. K. Lankveld, A. G. Oomen, P. Krystek [et al.] // Biomaterials. – 2010. — No 31. – P. 8350-8361.
  15. Twenty-Eight-Day Inhalation Toxicity Study of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats / Jun Ho Ji, Jae Hee Jung, Sang Soo Kim [et al.] // Inhalation Toxicology. – 2007. — No. 19. – P. 857–871.
  16. Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats / Y. S. Kim, J. S. Kim, H. S. Cho [et al.] // Inhalation Toxicology. – 2008. – Vol. 20. – P. 575–583.
- ### References
1. Boichuk T.M., Andriichuk N.J., Vlasyk L.I. 2012, “To an Evaluation of Toxicity of Silver Nanoparticles”, Clinical and Experimental Pathology Vol. XI, №4(42), pp. 151-158. (in Ukrainian)
  2. Vlasyk L. I., Andriychuk N. J., Davydenko I. S. 2014 “Peculiarities of pathomorphological changes in internal organs of rats as a result of subacute effect of silver nanodecahedrons”, Clinical and Experimental Pathology. Vol. X11I, №3(49). pp. 33-36. (in Ukrainian).
  3. Konovchuk V.M., Vlasik L.I.1., Akentyev S.O., Akentyeva M.S. 2014. “Acute heavy metal poisoning antidotes and intensive care”. Medicine of urgent conditions. № 2.pp. 79-82. (in Ukrainian).
  4. Ilika A.I., Chikirika I.A., Khalavka Y.B. 2011. “Photochemical Reduction of Silver Ions Leads to the Formation of Decahedral Nanoparticles”, Chernivtsi University Scientific Herald. Vol. 555.: Chemistry. pp. 40-43. (in Ukrainian)
  5. Kalinin I., Danchenko N., Tsudzevich B 2013. “Antioxidant system in rats under intoxication heavy metals and applying a-lipoic and folic acids”. Problems of nutrition. №1. pp. 55-58. (in Ukrainian)
  6. Trakhtenberg I.M., Dmytrukha N.M., Kozlov K.P.et al. 2012. “New approaches to prevention of heavy metal intoxication”. Tavricheskiy medico-biologicheskiiy vestnik. № 1 (57). pp. 253-257(in Ukrainian).
  7. Stepanskij G.A., Korbakova A.I. al. 1987. “Prediction of toxicity and danger of chemical compounds”. Moscow. – 120 pp. (in Russian).
  8. Trakhtenberg I.M., Timofeevskaya L.A., Kvyatkovskaya I.Ya. 1987. “Methods of study of chronic effect of chemical and biological pollutants”. Riga. -- 181pp. (in Russian).
  9. In vivo Genotoxicity of Silver Nanoparticles after 90-day Silver Nanoparticle Inhalation Exposure / J. S. Kim, J. H. Sung, J. H. Ji / Safety and Health at Work. – 2011. – Vol. 2. – P. 34-38.
  10. Lyn P. Mercury Toxicity and Antioxidants: Part I: Role of Glutathione and alpha-Lipoic Acid in the Treatment of Mercury Toxicity / P. Lyn // Alternative Medicine Review. —

2002. – Vol.7 (13). – P. 456-471.
11. Moini H. Antioxidant and prooxidant activities of  $\beta$ -lipoic acid and dihydrolipoic acid / H. Moini, L. Packer, N. E. L. Saris // *Toxicology and applied pharmacology*. – 2002. – Vol. 182, №. 1. – P. 84-90.
  12. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles / J. H. Jung, J. H. Ji, J. D. Park [et al.] // *Toxicological Science*. – 2009. – Vol. 108 (2). – P. 452-461.
  13. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles / Y. S. Kim, M. Y. Song, J. D. Park [et al.] // *Particle and Fibre Toxicology*. – 2010. – Vol. 7 (20). – P. 1-12.
  14. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes / D. P. K. Lankveld, A. G. Oomen, P. Krystek [et al.] // *Biomaterials*. – 2010. — No 31. – P. 8350-8361.
  15. Twenty-Eight-Day Inhalation Toxicity Study of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats / Jun Ho Ji, Jae Hee Jung, Sang Soo Kim [et al.] // *Inhalation Toxicology*. – 2007. — No. 19. – P. 857–871.
  16. Twenty-Eight-Day Oral Toxicity, Genotoxicity, and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats / Y. S. Kim, J. S. Kim, H. S. Cho [et al.] // *Inhalation Toxicology*. – 2008. – Vol. 20. – P. 575–583.

### Резюме

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ АЛЬФА-  
ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ В УСЛОВИЯХ  
ПОДОСТРОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ  
СЕРЕБРА ДЕКАЭДРИЧЕСКОЙ ФОРМЫ

*Андрийчук Н.И.*

*Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы*

В работе исследовано возможности протекторных свойств альфа-липоевой кислоты (АЛК) в дозах 12,5 и 25 мг/кг на лабораторных крысах в условиях подострого влияния раствора декаэдрических наночастиц серебра (НЧС) размером 45 нм в дозе 5 мг/кг. АЛК и раствор НЧС вводили 1 раз в сутки на протяжении 14 дней внутрибрюшинно. Протекторное действие липоевой кислоты выявлено с помощью морфометрического анализа патоморфологических изменений внутренних органов экспериментальных крыс. Профилактическое использование АЛК при

внутрибрюшинном введении в дозах 12,5 и 25 мг/кг приводит к уменьшению интенсивности повреждения печени, почек, сердца, легких и головного мозга НЧС декаэдрической формы в 2-2,5 раза. Проведенная оценка протекторного действия АЛК указывает на возможность использования данного препарата в дозе 12,5 мг/кг с целью профилактики вредного влияния НЧС декаэдрической формы.

**Ключевые слова:** наночастицы серебра, альфа-липоевая кислота, профилактика, морфометрический анализ.

### Summary

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF  
PROTECTIVE EFFECT OF ALPHA LIPOIC  
ACID UNDER CONDITIONS OF  
SUBACUTE EFFECT OF DECAHEDRON  
SILVER NANOPARTICLES

*Andriyчук N.I.*

*Bukovinian State Medical University*

In the research there were learned the possible protective properties of alpha lipoic acid (ALA) in dosages 12,5 and 25 mg/kg on laboratory rats in conditions of subacute effect of solution of 45 nm sized decahedron-shaped silver nanoparticles (SNP) in dosage 5 mg/kg. ALA and solution of SNP were injected intraperitoneally once a day during 14 days. Protective effect of ALA was identified with the help of morphometric analysis of pathomorphological changes in the internal organs of experimental rats. Prophylactic usage of intraperitoneal injections of ALA in dosages 12,5 and 25 mg/kg led to 2-2,5 reduction of intensities of decahedron-shaped NSP's injury of heart, liver, lungs, kidneys and brain. Carried assessment of protective usage of ALA shows a possibility of its usage in dose 12,5 mg/kg for prophylaxis of harmful effects of decahedron-shaped SNP.

**Keywords:** silver nanoparticles, alpha-lipoic acid, prophylaxis, morphometric analysis.

*Впервые поступила в редакцию 23.12.2014 г.  
Рекомендована к печати на заседании  
редакционной коллегии после рецензирования*