

ХАРАКТЕРИСТИКА ІМУНОТОКСИЧНОЇ ДІЇ СПОЛУК СВИНЦЮ З МІКРО- ТА НАНОЧАСТИНКАМИ

Н.М. Дмитруха доктор біол. наук,

С.П. Луговський доктор мед. наук, О.С. Лагутіна

ДУ «Інститут медицини праці НАМН України», м. Київ

РЕЗЮМЕ. Розвиток нанотехнології синтез наноматеріалів, що містять наночастинки важких металів, зокрема свинцю, не тільки відкривають нові перспективи для їх застосування, а й створюють нові загрози для здоров'я людини та довкілля.

Мета дослідження. Порівняльна оцінка впливу сполук свинцю, частинки яких знаходяться в межах мікро- та нанорозмірного діапазону, на показники природної неспецифічної резистентності організму та імунні органи щурів.

Матеріал і методи. Проведено субхронічний експеримент на 80 щурах — самцях Вістар, які були розподілені на 4 групи. Щури 1 та 2 груп щодня (5 днів на тиждень) отримували в черевну порожнину ін'єкції колоїдних розчинів сульфиду свинцю (PbS) з розміром частинок 26-34 нм і 50-80 нм, 3 групи — ін'єкції водного розчину нітрату свинцю ($Pb(NO_3)_2$) з частинками >400 нм, контрольним щурам вводили розчин стабілізатора поліфосфату натрію. Дослідження проводили після 30-ти введень сполук свинцю та через 30 діб після припинення введень. У крові контрольних і дослідних щурів визначали рівень цинкпротопорфірину-біомаркер свинцевої інтоксикації, фагоцитарну активність нейтрофілів крові та їхню кисень-активуєуючу здатність; рівні високо- і низькомолекулярних циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові. Проводили морфологічні дослідження імунних органів (селезінка та лімфатичні вузли брижі).

Результати дослідження. Встановлено, що наночастинки PbS, як і мікрочастинки $Pb(NO_3)_2$, порушували процес синтезу гемі і глобіну. Після 30-ти введень наночастинки PbS більшою мірою стимулювали поглинальну активність фагоцитів та утворення в них реактивних форм кисню; викликали зниження в крові рівнів ЦПК; збільшення відносної маси тимуса і селезінки, гіперплазію білої пульпи та збільшення розмірів лімфатичних фолікулів у селезінці, посилення мітотичної активності лімфоцитів, що свідчить про їхню більш виражену імуностимулюючу активність. Введення розчину $Pb(NO_3)_2$ викликало розвиток гемосидерозу в селезінці. В лімфатичних вузлах брижі після введення PbS спостерігали набряк стромы та гіпертрофію фолікулів на фоні апоптозу лімфоцитів у центрах розмноження фолікулів. Встановлені зміни зберігались і у постекспозиційний період.

Висновок. Наночастинки PbS виявляли більш виражену імунотоксичну дію, ніж мікрочастинки $Pb(NO_3)_2$, викликали порушення процесу синтезу гемі і глобіну, стимуляцію показників неспецифічної резистентності організму, формування імунної відповіді у вторинних імунних органах.

Ключові слова: наночастинки свинцю, імунні органи, імунотоксичність.

Серед важких металів — забруднювачів довкілля, свинець є найбільш розповсюдженим і найбільш ґрунтовно вивченим професійним і екологічним токсикантом. Проте незважаючи на великий обсяг виконаних досліджень, досі триває дискусія з приводу механізмів його токсичної дії, а також віддалених ефектів впливу малих доз [1-3].

Сьогодні перед дослідниками постала нова проблема — вивчення впливу свинцю на організм у формі наночастинок (НЧ). Адже відомо, що особливі технологічні умови, такі як висока температура, запиленість, наявність аерозолі, конденсації при виплавці свинцю, а також при зварюванні та різанні конструкцій, рекуперації свинцевих акумуляторів і батарей, сприяють надходженню у повітря робочої зони ультрадисперсних частинок свинцю нанорозмірного діапазону [4,5].

Окрім зазначеного, сьогодні завдяки нанотехнологіям отримані стабілізовані наночастинки та нанокристали сполук свинцю (PbS, PbSe, PbTe), так звані «квантові точки», розміром 4-10 нм, які використовуються в напівпровідниках, сонячних батареях, входять до складу сучасних полімерних композитів [6].

Відомо, що НЧ посідають проміжне місце між окремими атомами (молекулами) та макротілами. Малий розмір, форма, заряд, структура, велика площа поверхні НЧ металів

надають їм унікальних фізико-хімічних властивостей, що визначають особливості їх біологічної дії. Так, малі розміри НЧ сприяють їх вільному проникненню в клітини, зв'язуванню з білками, вбудовуванню у мембрани, проникненню в органели. Велика питома поверхня НЧ зумовлює збільшення адсорбційної ємності, хімічної реакційної здатності, каталітичної активності. Наночастинкам притаманна висока здатність до кумуляції, оскільки їх дрібні розміри є перешкодою для розпізнавання різними структурами, їх біотрансформації. Завдяки чому НЧ накопичуються та повільно виводяться з організму [7,8].

Свинець відноситься до високо кумулятивних отрут. Отже, високі кумулятивні властивості притаманній НЧ, тому небезпечність від використання свинцю у наноформі стає ще більш загрозливою. Детальне вивчення поведінки НЧ сполук свинцю у живому організмі, його вплив на функціонування органів і систем є важливою токсиколого-гігієнічною проблемою. Нагальним є питання взаємодії НЧ з компонентами імунної системи, оскільки вона однією з перших реагує на надходження в організм чужорідних агентів та відіграє провідну роль у його захисті та забезпеченні гомеостазу.

У попередніх дослідженнях нами показано, що свинець здатний проявляти імунотоксичну

дію, стимулювати оксидативний стрес у фагоцитах, утворення імунних комплексів та формування імунної відповіді у вторинних імунних органах [9,10]. Що стосується впливу сполук свинцю у вигляді НЧ на імунну систему організму, такі дані на сьогодні в літературі відсутні.

Мета дослідження — порівняльна оцінка впливу сполук свинцю, частинки яких знаходяться в межах мікро- та нанорозмірного діапазону, на показники природної неспецифічної резистентності організму та імунні органи щурів.

Матеріали та методи дослідження. Об'єктом експериментального дослідження були 80 статевозрілих щурів самців лінії Вістар масою 160–200 г, які утримувались у стаціонарних умовах віварію на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до водогінної води. Досліджували колоїдні розчини сульфиду свинцю (PbS) з розміром частинок 26–34 нм і 50–80 нм і стабілізовані у поліфосфаті натрію (NaPO₃)_n, які були синтезовані у відділі фотохімії Інституту фізичної хімії ім. Л.В. Писаржевського НАН України, а також розчин нітрату свинцю (Pb(NO₃)₂; Aldrich), розмір частинок в якому перевищував 400 нм — мікрочастинки (МЧ). Розміри частинок у розчинах визначали методом лазерної кореляційної спектроскопії в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Усі експерименти на щурах були проведені у відповідності до вимог Європейської конвенції щодо гуманного поводження з лабораторними хребтними тваринами [11].

Проведено 2 серії експериментів, в яких щури були розділені на 4 групи по 10 тварин у кожній. Щури 1 та 2 груп щодня (5 днів на тиждень) отримували в черевну порожнину ін'єкції колоїдних розчинів PbS у дозі 1,08 мг/кг маси тіла, а щури 3 групи — ін'єкції водного розчину Pb(NO₃)₂ у дозі 1,5 мг/кг маси. В якості контролю були використані щури, які отримували ін'єкції 1,0 мл розчину поліфосфату натрію. Дослідження проводили після 30-ти введень сполук свинцю та через 30 діб постекспозиційного періоду (після припинення введення досліджуваних речовин). Периферичну кров та імунні органи забирали після декапітації тварин, попередньо наркотизованих етаміналом натрію (50 мг/кг).

У крові контрольних і дослідних щурів визначали рівень цинкпротопорфірину (Zn-PP) — біомаркера розвитку свинцевої інтоксикації за допомогою гемофлюориметра 206Д (США) [12]. Стан неспецифічної резистентності організму щурів оцінювали за показниками фагоцитарної (поглинальної) активності нейтрофілів крові (фагоцитарний індекс (ФІ) та фагоцитарне число (ФЧ)); кисень-активуючої здатності нейтрофілів в НСТ-тесті (спонтанний та сти-

мульований); рівні високо- і низькомолекулярних циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в сироватці крові [13]. Для виконання морфологічних досліджень імунні органи (селезінка і лімфатичні вузли брижі) у піддослідних щурів відбирали після їхньої декапітації, фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в етанолах, просвітлювали у ксилолі та заключали в парафін. З парафінових блоків готували мікротомні зрізи (5–7 мкм), які фарбували гематоксиліном і еозином та за методом Перлса (реакція на берлінську лазур) для виявлення сполук заліза (II) [14]. Всі морфологічні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX42.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за середньоарифметичним значенням показників (M) та їх медіани (Me), середньоквадратичним відхиленням (σ) та середньою похибкою (m), розрахованих за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Excel 2003. Оцінку розподілення варіаційних рядів і статистичних гіпотез проводили за критеріями t — Стьюдента та Уїлкоксона—Манна—Уїтні, при прийнятому рівні значимості показників, α = 0,05.

Результати та їх обговорення. Одним з проявів негативного впливу свинцю на організм є розвиток анемії внаслідок ураження органів кровотворення, порушення еритропоезу, пригнічення процесу синтезу гемату та глобіну (особливо α-ланцюга). Внаслідок порушення синтезу гемату відбувається збільшення вмісту Zn-PP в крові, який визнано біомаркером розвитку свинцевої інтоксикації [15].

За результатами дослідження у крові піддослідних щурів, яким вводили розчини PbS і Pb(NO₃)₂, порівняно з тваринами контрольної групи спостерігали статистично значиме збільшення концентрації Zn-PP (рис.1). Так, після 30-ти введень колоїдного розчину PbS з частинками 26–34 нм і 50–80 нм вміст Zn-PP в крові піддослідних щурів підвищився в 3,0 і 3,3 рази порівняно з контрольними даними, а після введення розчину Pb(NO₃)₂ в 2,6 рази (p_u < 0,05).

Через місяць після припинення введення сполук свинцю рівень Zn-PP в крові щурів дослідних груп залишався підвищеним у порівнянні з контрольною групою, а саме у 3,2 і 2,8 рази у щурів, яким вводили PbS 26–34 нм і 50–80 нм відповідно, та в 2,3 рази у тварин, що отримували Pb(NO₃)₂ (рис.1). Отримані дані свідчать про те, що свинець у формі НЧ, як і мікрочастинки, може втручатися в порфіриновий обмін, порушувати синтез гемату та глобіну, при цьому НЧ PbS виявились більш активними, ніж МЧ Pb(NO₃)₂.

Дослідження впливу неорганічних сполук

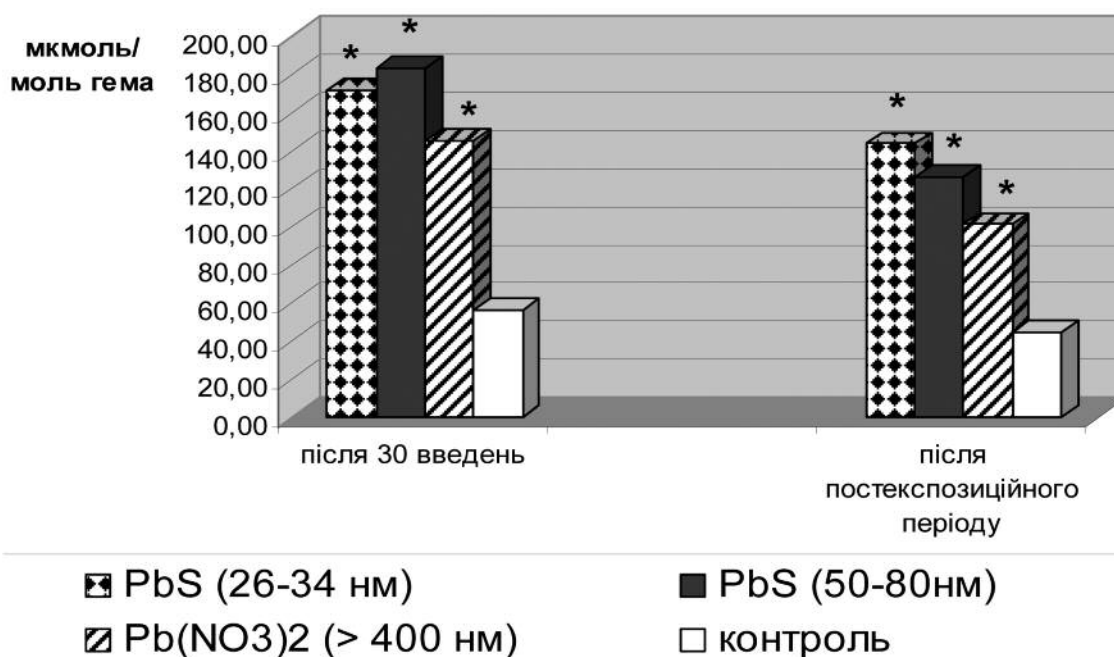


Рис. 1. Рівень цинкпротопорфірину (Zn-PP) в крові щурів після введення розчинів сполук свинцю з мікро- і наночастинками ($M \pm m$).

Примітка, * – статистично значимо з контролем при $\alpha=0,05$ ($p_u < 0,05$);

свинцю, у вигляді мікро- та нанорозмірних частинок на показники, що забезпечують неспецифічну резистентність, виявили наступні зміни (табл. 1). Встановлено збільшення фагоцитарної активності нейтрофілів крові піддослідних щурів після введення наночастинок PbS обох розмірів і її пригнічення за дії розчину $Pb(NO_3)_2$ з МЧ. Так, після введення НЧ PbS, розміром 26–34 нм і 50–80 нм, ФІ нейтрофілів збільшився порівняно з контролем на 20,5% і 26,5%, відповідно ($p_u < 0,05$), а ФЧ — на 27,0% і 28,0% ($p_u < 0,05$). Тоді як, після 30-ти введень розчину $Pb(NO_3)_2$ у щурів спостерігалось зниження ФІ і ФЧ порівняно з контролем на 28,0% і 25,0% відповідно ($p_u < 0,05$).

Аналіз змін кисень-активууючої здатності нейтрофілів за показниками НСТ-тесту виявив стимулюючу дію сполук свинцю як з нано- та мікророзмірними частинками (табл. 1). Зокрема, після введення наночастинок PbS 26–34 нм і 50–80 нм показник спонтанного НСТ-тесту збільшився порівняно з контролем у 2,0 і 1,9 рази, а мікророзмірних частинок $Pb(NO_3)_2$ — в 1,4 рази відповідно, ($p_u < 0,05$). Це свідчить про те, що НЧ свинцю більш активно генерують оксидативний стрес в нейтрофілах, ніж МЧ. Разом з цим, для стимульованого НСТ-тесту було встановлено, що введення НЧ PbS зумовило зниження цього показника порівняно з контролем, що свідчить про зниження функціональних резервів фагоцитів, яке переважно було характерне за умови введення

НЧ PbS розміром 50–80 нм (на 38%; $p_u < 0,05$).

Дослідження показників ФАН нейтрофілів крові щурів через 30 діб постекспозиційного періоду виявили, що встановлені зміни мали виражений характер і таку ж направленість (табл. 1). Отримані результати дозволяють констатувати, що НЧ PbS, особливо розміром 50–80 нм, володіють більш вираженою стимулюючою дією, ніж PbS розміром 26–34 нм та МЧ $Pb(NO_3)_2$.

Визначення вмісту ЦІК у сироватці крові щурів за дії нанорозмірних частинок PbS виявило статистично значиме порівняно з контролем зменшення їх концентрацій у крові піддослідних тварин обох серій дослідження (табл.2).

Концентрація високомолекулярних ЦІК у сироватці крові щурів після 30-ти введень колоїдних розчинів PbS з розміром частинок 26–34 нм і 50–80 нм зменшилася порівняно з контролем у 3,4 рази, а низькомолекулярних — у 9,1 і 6,2 рази відповідно ($p_u < 0,05$). Після припинення введення вміст ЦІК у сироватці крові піддослідних щурів, що отримували PbS, ще більше знизився, зокрема високомолекулярних — у 4,2 і 3,5 рази, а низькомолекулярних — у 9,8 і 8,5 рази порівняно з контролем ($p_u < 0,05$). Тоді як після 30-ти введень $Pb(NO_3)_2$ у піддослідних тварин відзначено збільшення рівня високомолекулярних ЦІК на 17,6% і зниження низькомолекулярних — на 20,6%. Через 30 діб постекспозиційного періоду у щурів, які отримували нітрат свинцю, вміст ЦІК високомоле-

Показники фагоцитарної активності нейтрофілів крові щурів після введення розчинів сполук свинцю з мікро- і наночастинками

Показники	Серія та групи тварин			
	Контрольна	I PbS (26-34 нм)	II PbS (50-80 нм)	III Pb(NO ₃) ₂ (>400 нм)
Серія I (після 30 –ти введень)				
ФІ, %	26,40 ±0,75	31,80±1,02*	33,40±1,08*	19,20 ±0,86*
ФЧ, ум.од.	2,64±0,07	3,36±0,17*	3,38±0,04*	1,98 ±0,07*
НСТ-тест (спонтан.),%	12,20 ±1,02	24,60 ±1,33*	26,80 ±1,50*	17,20 ±0,49*
НСТ-тест (стимул.),%	22,80 ±1,50	21,60 ±1,17	14,20 ±1,20*	22,60 ±0,98
Серія II (через 30 днів після експозиції)				
ФІ, %	28,80±1,50	26,60±0,87	35,20±1,02*	20,80±0,86*
ФЧ, ум.од.	2,96±0,19	2,88±0,34	3,20±0,09	2,08±0,70*
НСТ-тест (спонтан.),%	10,80 ±0,38	28,00 ±0,89*	25,60 ±1,17*	15,40 ±0,87*
НСТ-тест (стимул.),%	21,40 ±1,08	20,60 ±1,72	14,00 ±0,71*	21,00 ±1,10

Примітка, * – статистично значимо з контролем при $\alpha=0,05$ ($p_u<0,05$);

Вміст ЦІК у сироватці крові щурів після введення розчинів сполук свинцю з мікро- і наночастинками

Серія та групи тварин	Рівень ЦІК, од. опт. густ.	
	Високомолекулярні ЦІК, (ПЕГ – 3,5 %)	Низькомолекулярні ЦІК, (ПЕГ – 7%)
Серія I (після 30 –ти введень)		
Контрольна	0,017±0,009	0,155±0,006
Група I (PbS – 26-34 нм)	0,005±0,001*	0,017±0,003*
Група II (PbS – 50-80 нм)	0,005±0,002*	0,026±0,006*
Група III (Pb(NO ₃) ₂ – > 400 нм)	0,020±0,002	0,123±0,003*
Серія II (через 30 днів після експозиції)		
Контрольна	0,021±0,002	0,127±0,004
Група I (PbS – 26-34 нм)	0,005±0,001*	0,013±0,001*
Група II (PbS – 50-80 нм)	0,006±0,001*	0,015±0,001*
Група III (Pb(NO ₃) ₂ – > 400 нм)	0,015±0,001*	0,230±0,025*

Примітка, * – статистично значимо з контролем при $\alpha=0,05$ ($p_u<0,05$)

кулярних навпаки знизився на 28,5%, а низькомолекулярних збільшився майже вдвічі (на 81,1 %, $p_u < 0,05$) (табл. 2).

Зменшення рівня ЦІК у сироватці крові піддослідних щурів після введення їм розчину PbS з НЧ може бути обумовлене: підвищенням фагоцитарної активності нейтрофілів, які їх утилізують; структурними змінами антитіл, а також адсорбцією імунних комплексів на НЧ. Збільшення рівня ЦІК у сироватці крові щурів за дії нітрату свинцю вказує на посилення гуморальної імунної відповіді на надходження в організм свинцю як чужорідного агента.

Інтегральним показником токсичної дії речовин є зміни відносної маси внутрішніх органів та їх структури, які відображають порушення функції.

У ссавців проліферація та диференціювання імунокомпетентних клітин відбувається у центральних органах імунної системи. Так, Т-лімфоцити дозрівають у тимусі, а В-лімфоцити – у кістковому мозку. Надалі ці клітини мігрують до периферичних органів імунної системи (селезінка, лімфатичні вузли), в яких відбувається формування гуморальної та клітинної імунної відповіді [16].

Результати проведених експериментальних досліджень показали, що введення PbS з НЧ розміром 50–80 нм, а також $Pb(NO_3)_2$ МЧ супроводжувалося вірогідним у порівнянні з контролем збільшенням відносної маси тимуса на 42% і 38,6% ($p_u < 0,05$) та відносної маси

селезінки – на 9,5 % і 38,1 % відповідно. Ці дані вказують на те, що сполуки свинцю з розміром частинок 50–80 нм і більше 400 нм можуть викликати зміни у структурі і функції імунних органів (табл.3).

Після припинення надходження сполук свинцю в організм піддослідних щурів збільшилася відносна маса тимуса (на 35,7 % і 28,6 %) у 2 і 3 дослідних групах, тоді як маса селезінки в усіх дослідних щурів мала тенденцію до зниження.

Результати морфологічних досліджень показали, що в селезінці щурів, які зазнавали дії НЧ PbS з розміром частинок 26–34 нм і 50-80 нм, виявлялися схожі зміни, такі як виражена гіпертрофія білої та червоної пульпи органа (рис. 2. а, б). При цьому в них відмічали гіпертрофію лімфатичних фолікулів, переважно за рахунок проліферації лімфоцитів центральної та маргінальної зони, а також гіпертрофію та гіперплазію макрофагів, у яких в цитоплазмі виявляли накопичення дрібних, кристалоподібних цитоплазматичних включень (рис. 2. в, г).

Це свідчить про те, що нанорозмірні частинки PbS здатні викликати відповідь в імунних органах, що реалізується через стимулюючий вплив на лімфоцити та макрофаги. При цьому останні однаковою мірою можуть реагувати не тільки на екзогенний вплив нанота мікрочастинок сполук свинцю, а й на ініційовану сполуками свинцю прискорену загибель еритроцитів.

Аналогічні за характером зміни (гіпертро-

Таблиця 3

Зміни показника відносної маси імунних органів щурів при дії сполук свинцю ($M \pm m$)

Серія та групи тварин	Відносна маса селезінки, г	Відносна маса тимуса, г
Серія I (після 30 –ти введень)		
Контрольна	0,42±0,04	0,19±0,02
Група I (PbS – 26-34 нм)	0,40±0,02	0,14±0,02
Група II (PbS – 50-80 нм)	0,46±0,06	0,27±0,09*
Група III ($Pb(NO_3)_2$ – > 400 нм)	0,58±0,04*	0,26±0,02*
Серія II (через 30 діб після експозиції)		
Контрольна	0,41±0,02	0,14±0,01
Група I (PbS – 26-34 нм)	0,35±0,01	0,12±0,01
Група II (PbS – 50-80 нм)	0,35±0,06	0,19±0,01*
Група III ($Pb(NO_3)_2$ – > 400 нм)	0,38±0,02	0,18±0,02*

Примітка, * – статистично значимо з контролем при $\alpha=0,05$ ($p_u < 0,05$);

фія білої та червоної пульпи) виявлялися також у селезінці щурів, яким вводили $Pb(NO_3)_2$. Разом з тим за механізмом формування таких змін вони суттєво відрізнялися від тих, що були зумовлені впливом НЧ PbS. Так, характерною відмінністю дії нітрату свинцю був розвиток вираженого гемосидерозу селезінки щурів унаслідок вираженої гіперплазії та гіпертрофії сидерофагів червоної пульпи органа, цитоплазма яких містила надмірну кількість дрібних включень, що позитивно реагують на берлінську лазур. За гістохімічним методом Перлса так виявляються сполуки двовалентного заліза (рис. 3). Аналогічний розвиток гемосидерозу спостерігався в селезінці щурів при хронічній інтоксикації ацетатом свинцю [17].

При гістологічному дослідженні лімфатичних вузлів брижі щурів, які зазнавали дії PbS, на відміну від тварин, яким вводили $Pb(NO_3)_2$, було виявлено набряк стромы вузлів та гіпертрофію їх лімфатичних фолікулів. При цьому токсична дія НЧ PbS характеризувалася високою інтенсивністю апоптозу лімфоцитів у лімфатичних фолікулах цих вузлів і як наслідок – компенсаторною гіперплазією баластних клітин у центрах розмноження фолікул, що характеризувалось збіль-

шенням кількості плазмочитів (рис. 4).

Подібні зміни у структурі імунних органів щурів, зокрема збільшення в селезінці та лімфатичних вузлах числа лімфатичних фолікулів зі світлими центрами розмноження та кількості в них плазмобластів, були виявлені за умови введення ацетату свинцю. Це і є ознаками формування імунної відповіді гуморального типу [10].

Підсумовуючи викладені результати дослідження з визначення впливу сполук свинцю з НЧ і МЧ на формування неспецифічних та специфічних захисних реакцій у щурів, можна дійти наступних висновків:

1. Введення сполук свинцю як з МЧ-, так і НЧ викликало збільшення рівня Zn-PP у крові піддослідних щурів, що свідчить про порушення синтезу гемі і глобіну та розвиток свинцевої інтоксикації.
2. Зміни показників неспецифічного природного імунітету після введення НЧ PbS характеризувались стимуляцією поглинальної активності фагоцитів та респіраторного вибуху в них з утворенням реактивних форм кисню, що вказує на формування оксидативного стресу в цих клітинах.

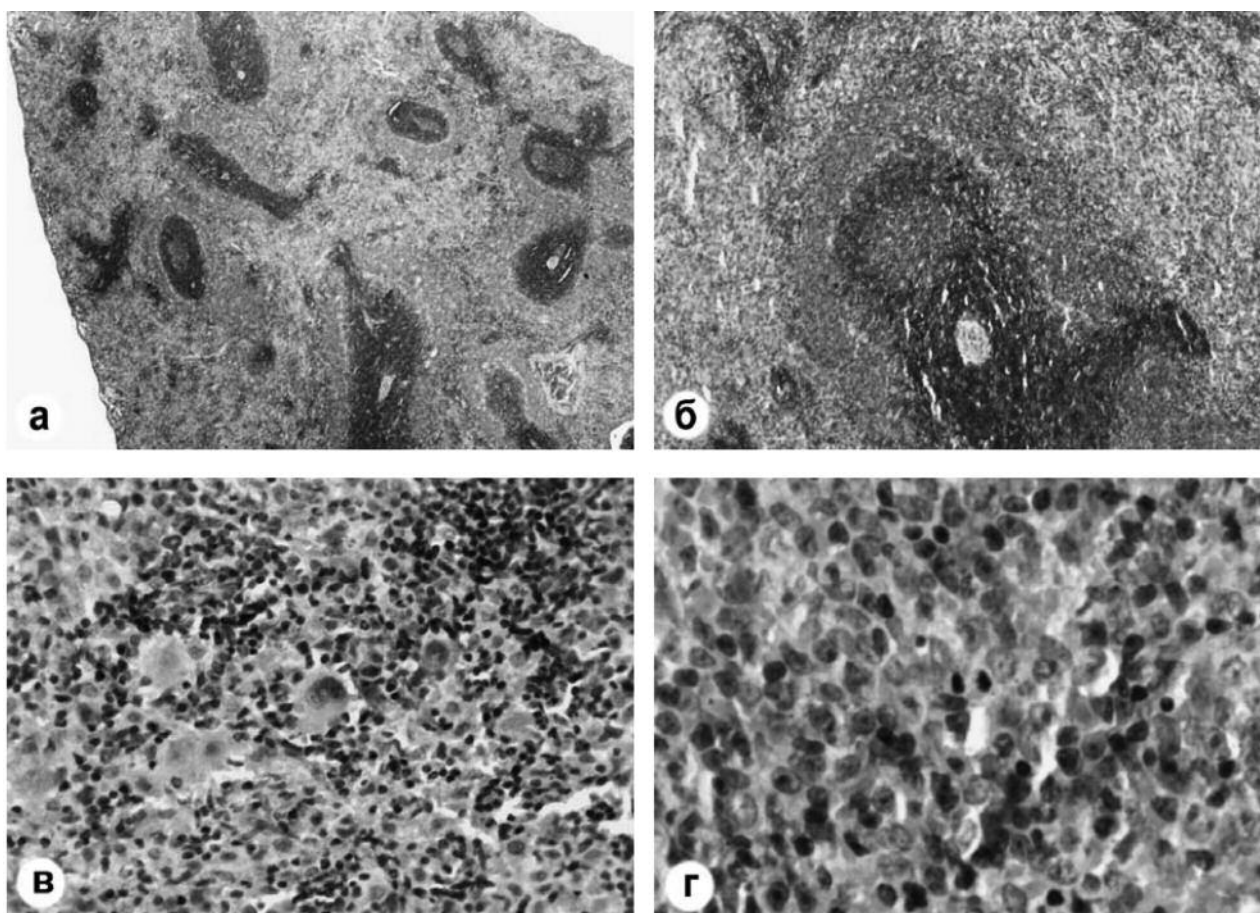


Рис. 2. Морфологічні зміни селезінки щурів при впливі PbS з розміром наночастинок 26–34 нм: а) – гіпертрофія та гіперплазія білої та червоної пульпи; б) – гіпертрофія центральної та маргінальної зон лімфатичних фолікулів; в) – гіперплазія та гіпертрофія макрофагів червоної пульпи; г) – висока мітотична активність лімфоцитів у лімфоїдних фолікулах. Гематоксилін та еозин. 36.: а – 75; б – 120; в – 200; г – 600.

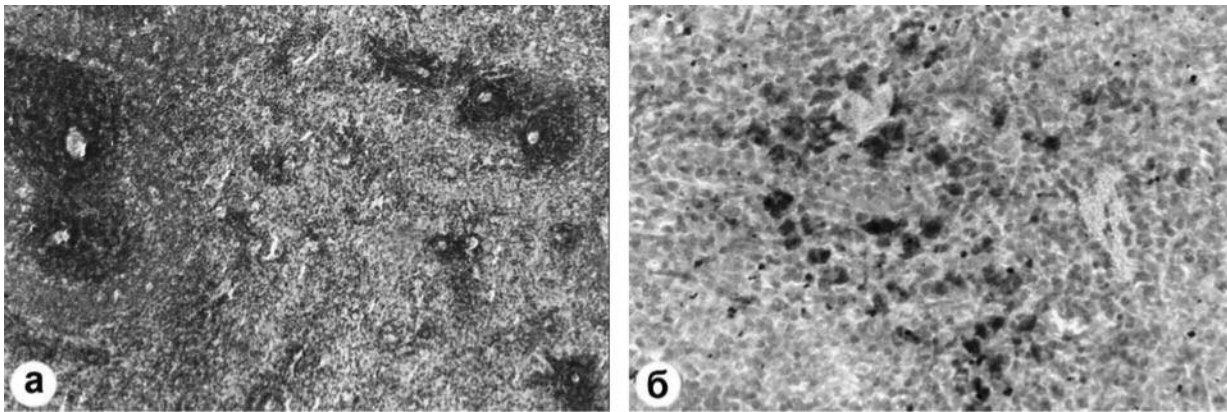


Рис. 3. Морфологічні зміни селезінки щурів при впливі $Pb(NO_3)_2$, з розміром частинок понад 400 нм: а) – гіпертрофія білої та червоної пульпи; б) – гемосидероз селезінки, зумовлений надмірним накопиченням заліза (II) у цитоплазмі сидерофагів червоної пульпи. а) – гематоксилін і еозин; б) – реакція Перлса. Зб. а) – 120; б) – 400.

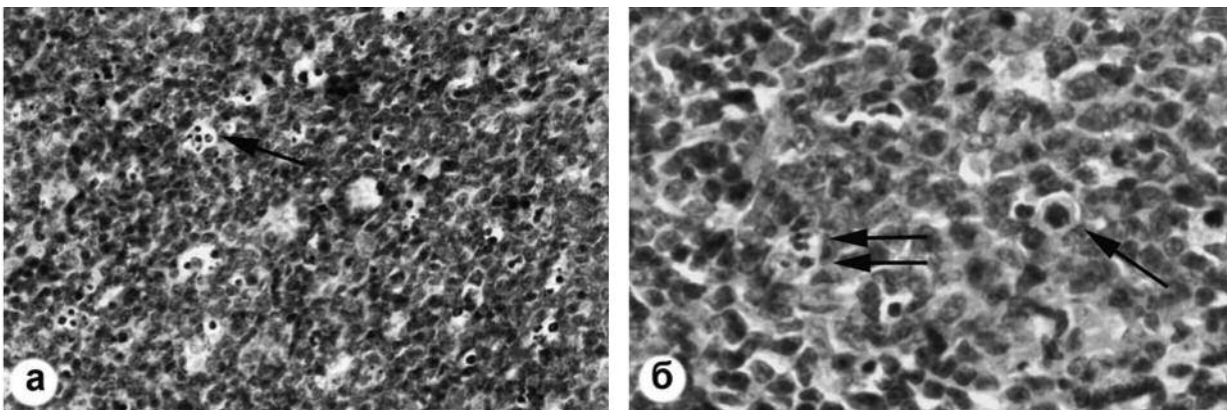


Рис. 4. Морфологічні зміни внутрішньочеревних лімфатичних вузлів при впливі PbS з розміром наночастинок 50-80 нм: а) апоптоз лімфоцитів у лімфоїдних фолікулах вузла з утворенням апоптичних тілець (вказано стрілкою); б) апоптоз лімфоцитів в центрі розмноження лімфоїдного фолікула супроводжується плазмабластною реакцією (плазмобласти вказано стрілкою, апоптозні тільця – подвійною стрілкою). Гематоксилін-еозин. Зб.: а – 200; б – 600.

- Зниження вмісту низько- і високомолекулярних ЦІК у крові щурів після введення НЧ PbS , особливо у постекспозиційний період, порівняно з контролем і тваринами, які зазнавали впливу мікрочастинок $Pb(NO_3)_2$, може бути результатом активації фагоцитозу, порушення структури імуноглобулінів (антитіл) та адсорбції ЦІК на НЧ.
- Вплив НЧ PbS на імунні органи щурів характеризувався збільшенням відносної маси тимуса і селезінки, гіперплазії білої пульпи і лімфоїдних фолікулів та посилен-

ням мітотичної активності лімфоцитів селезінки. Вплив мікрочастинок $Pb(NO_3)_2$ викликав подібні, але менш виразні зміни у селезінці, а також гемосидероз. У лімфатичних вузлах брижі за дії НЧ PbS спостерігали набряк стромы та гіпертрофію лімфатичних фолікулів, гіперплазію в них плазмочитів, а також високу інтенсивність апоптозу лімфоцитів у центрах розмноження. Все це свідчить про активацію імунної відповіді у вторинних імунних органах.

ЛІТЕРАТУРА

- Inorganic lead. Environ. Health Criteria; 165 [Electronic resource]: International Programme Chemical Safety/ WHO. – Geneva, 1995. – Mode of access: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc165.htm>. – Title from the screen.
- Измеров Н. Ф. К проблеме оценки воздействия свинца на организм человека / Н.Ф. Измеров // Медицина труда и пром. экология. – 1998. – № 12. – С. 1–4.
- Кундиев Ю.И. Химическая безопасность в Украине / Ю.И. Кундиев, И.М. Трахтенберг / Ежегодные чтения, посвященные памяти Е.И. Гончарука (полный текст доклада), Киев, Издательский дом "Авиценна". – 2007. – 71 с.
- Шушкевич Н.И. Влияние свинцового производства на популяцию населения промышленного города / Н.И. Шушкевич / Автореф. дис. на получение научн. степени докт. биол. наук. – М., 2008. – 42 с.
- Демецкая А.В. Частицы нанодиапазона: возможный вклад в развитие профессионально обусловленной патологии / А.В. Демецкая, Т.К. Кучерук, В.А. Мовчан // Український журнал з проблем медицини праці. – 2006, №1. – С.62–67.

- Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors / R. Hardman // Environ. Health Perspect. — 2006. — Vol. 114(2). — P. 165–172.
- Картель М.Т. Концепція методології ідентифікації та токсикологічних досліджень наноматеріалів і оцінки ризику для людського організму та довкілля при їх виробництві і застосуванні /М.Т.Картель, В.П.Терещенко /Межведомственный сборник научн. Трудов «Химия, физика и технология поверхности», Киев, Наукова думка. —2008.— Выпуск 14. —С.565–583.
- Проданчук Н.Г. Нанотоксикология: состояние и перспективы исследований/ Н.Г. Проданчук, Г.М. Балан // Современные проблемы токсикологии. —2009, №3–4. — С.4–18.
- Дмитруха Н. М. Экспериментальне дослідження впливу важких металів (свинцю та кадмію) на неспецифічну резистентність організму білих щурів / Н. М. Дмитруха // Современные проблемы токсикологии. — 2004. — № 4. — С. 27–31.
- Диденко М. Н. Морфофункциональная характеристика органов иммунной системы, лимфоцитов селезенки и периферической крови у крыс при свинцовой интоксикации / М. Н. Диденко, Н. Н. Дмитруха // Проблемы медицины труда. — 1998. — С. 160–164.
- Загальні етичні принципи експериментів на тваринах //Ендокринологія. — 2003. — № 8 (1). — С. 142–145.
- Instruction manual of ZP HEMATOFLUOROMETER Models 206 and 206 D, 1996.
- Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Беркало Л.В., Бобович О.В., Боброва Н.О. та ін.]; за ред. Кайдашева І.П. — Полтава: Полімет, 2003.—320 с.
- Микроскопическая техника: Руководство / [под ред. Д. С. Саркисова и Ю. Л. Перова]. — М.: Медицина, 1996. — 544 с.
- Велиев Б. А. К вопросу изучения свинцовой анемии / Б. А. Велиев // Гематология и трансфузиология. — 1989. — Т. 34, — № 7. — С. 19–22.
- Імунологія [Вершигора А.Ю., Пастер Є.У., Колибо Д.В. та ін.] Підручник. К.: Вища школа, 2005. — 599 с.
- Луговський С.П. Гістоморфологічна характеристика гемосидерозу при експериментальній свинцевій інтоксикації / С.П. Луговський // Актуальные проблемы транспортной медицины. — 2009. — № 2(16). — С.124-132.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИМУНОТОКСИЧНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ СВИНЦА С МИКРО- И НАНОЧАСТИЦАМИ

Н.Н. Дмитруха, С.П. Луговской, О.С. Лагутина

РЕЗЮМЕ. Развитие нанотехнологии и синтез наноматериалов, содержащих наночастицы тяжелых металлов, в частности свинца, не только открывает новые перспективы для их применения, но и создает новые угрозы для здоровья человека и окружающей среды.

Целью исследования была сравнительная оценка влияния соединений свинца, частицы которых находятся в пределах микро — и наноразмерного диапазона, на показатели естественной неспецифической резистентности организма и иммунные органы крыс.

Материал и методы. Проведен субхронический эксперимент на 80 крысах — самцах Вистар, которые были разделены на 4 группы. Крысы 1 и 2 групп ежедневно (5 дней в неделю) получали в брюшинную полость инъекции коллоидных растворов PbS с размером частиц 26–34 нм и 50–80 нм, 3 группы — инъекции водного раствора $Pb(NO_3)_2$ с частицами > 400 нм, контрольным крысам вводили раствор стабилизатора полифосфата натрия. Исследования проводились после 30-ти введений соединений и через 30 дней после прекращения введений. В крови контрольных и опытных крыс определяли: уровень цинкпротопорфирина—биомаркера развития свинцовой интоксикации, фагоцитарную активность нейтрофилов крови, их кислород-активирующую способность; уровни высоко — и низкомолекулярных циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови, морфологические исследования иммунных органов (селезенка и лимфатические узлы брыжеейки).

Результаты исследования. Установлено, что наночастицы PbS, как и микрочастицы $Pb(NO_3)_2$ нарушали процесс синтеза гема и глобина, повышали уровень цинкпротопорфирина. НЧ PbS после 30-ти введений в большей степени стимулировали поглотительную активность фагоцитов, образование реактивных форм кислорода; снижение в крови уровня ЦИК; вызывали увеличение относительной массы тимуса и селезенки, гиперплазию белой пульпы и увеличение размеров лимфатических фолликулов в селезенке, усиление митотической активности лимфоцитов, что свидетельствует о более выраженной иммуностимулирующей активности свинца в форме НЧ. Введение $Pb(NO_3)_2$ вызывало еще развитие гемосидероза в селезенке. В брыжеечных лимфатических узлах после введения PbS наблюдали отек стромы и гипертрофию лимфатических фолликулов, а также гиперплазию бластных клеток с появлением плазмобластов на фоне высокой интенсивности апоптоза лимфоцитов в центрах размножения фолликулов. Установленные изменения сохранялись и в постэкспозиционном периоде.

Выводы. Наночастицы PbS проявляли более выраженное иммунотоксическое действие, чем микрочастицы $Pb(NO_3)_2$, вызывали нарушение процесса синтеза гема и глобина, стимуляцию показателей неспецифической резистентности организма, формирование иммунного ответа во вторичных иммунных органах.

Ключевые слова: наночастицы свинца, иммунные органы, иммунотоксичность.

EVALUATION OF IMMUNOTOXIC EFFECT OF LEAD COMPOUNDS WITH MICRO-AND NANOPARTICLES

N.M. Dmytrukha, S.P. Luhovsky, O.S. Lahutina

SUMMARY. Development of nanotechnology, synthesis of nanomaterials containing nanoparticles of heavy metals, particularly lead, not only opens up new prospects for their use but also creates new challenges for human health and the environment.

The aim of the study was a comparative evaluation of the influence of lead compounds, which particles are within the micro- and nanoscale range on the natural nonspecific body's resistance and immune organs of rats.

Material and methods. The subchronic studies were performed in rats Wistar males which were divided into 4 groups. The rats of the 1 and 2 groups daily (5 days a week) received the intraperitoneal injections of PbS solutions (particle size 26–34 nm and 50–80 nm), 3 group — injection of the aqueous solution of $Pb(NO_3)_2$, control — a solution of sodium polyphosphate. The blood and immune organs of the rats were taken after decapitation. Hematological, immunological studies have been undertaken for all groups of rats. The study was conducted after 30 injections of lead compounds and 30 days after exposure period. In the blood of the control and experimental rats were determined level of zincprotoporphyrin — biomarker of lead intoxication; phagocytic activity of neutrophils, oxygen — activating ability of phagocytes; levels of high- and low molecular circulating immune complexes (CIC) in serum; morphological studies of immune organs (spleen and lymph nodes).

Results. It was established that PbS nanoparticles as $Pb(NO_3)_2$ microparticles after 30 injections stimulated activity of phagocytes and the respiratory burst in them with formation of reactive oxygen, caused the increase of the relative weight of thymus and spleen, hyperplasia of white pulp and increased size of lymph follicles in the spleen and the mitotic activity of lymphocytes. This is indicating that the PbS nanoparticles had more immunostimulatory activity. Injections of $Pb(NO_3)_2$ caused the development of hemosiderosis in the spleen. In the lymph nodes under the action of PbS were observed changes in the form of stromal edema and hypertrophy of lymph follicles and hyperplasia in these cells particular plasmoblasts, apoptosis of lymphocytes in germinative centres high intensity. The violations of the studied parameters persisted in period after exposure.

Summary. PbS nanoparticles showed a more immunotoxic effect than microparticles of $Pb(NO_3)_2$, caused a disturbance of of heme and globin synthesis, stimulation of nonspecific resistance of the organism, the immune response in the immune organs.

Key words: nanoparticles of lead, immune organs, immunotoxicity.

Надійшла до редакції 28.03.2014 р.