

Профилактическая токсикология и гигиеническое нормирование

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Николаева Т.В., Полякова В.С., Сетко Н.П., Воронина Л.Г.

СООТНОШЕНИЕ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА В КОЖЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ХЕЛАТОРОВ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ

ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, 460000, Оренбург

В модельном эксперименте на мышах линии C57BL/6 установлены особенности влияния тяжелых металлов и хелаторов эссенциальных металлов на пролиферацию и апоптоз эпителиальных клеток кожи (кератиноцитов). В рамках исследования 40 экспериментальных животных были распределены в семь опытных и контрольную группу по пять особей в каждой. Пролиферативную и апоптотическую активность кератиноцитов определяли иммуногистохимическим методом и оценивали путем расчета индекса пролиферации и индекса апоптоза в клетках покровного эпителия и эпителиальных клетках волосяных фолликулов в стадию, соответствующую позднему анагену. Введение животным сульфата цинка, бихромата натрия и хелатора цинка (N,N,N',N'-тетраakis(2-пиридилметил)-этилендиамин – ТПЭН) приводило к статистически значимому увеличению пролиферативной активности кератиноцитов. Снижение индекса пролиферации выявлено у животных, получавших ацетат свинца и хелатор меди (тетратиомолибдат аммония – ТТМ). Введение сульфата никеля и хелатора железа (дефероксамин) не повлияло на пролиферативную активность кератиноцитов. Индукция апоптоза эпителиальных клеток отмечена при поступлении в организм животных сульфата никеля, бихромата натрия, ацетата свинца, хелатора меди (ТТМ) и хелатора цинка (ТПЭН). У мышей, получавших сульфат цинка и дефероксамин, апоптотическая активность кератиноцитов не изменилась. Применение кластерного анализа позволило классифицировать вводимые экспериментальным животным вещества с учетом их одновременного влияния на исследуемые клеточные процессы. Показано, что ацетат свинца, хелатор железа (дефероксамин) и хелатор меди (тетратиомолибдат аммония) снижают пролиферативную активность кератиноцитов и незначительно влияют на апоптоз эпителиальных клеток кожи. Сульфат цинка, сульфат никеля, бихромат натрия и хелатор цинка (ТПЭН) активируют клеточную пролиферацию и индуцируют апоптоз кератиноцитов.

Ключевые слова: тяжелые металлы; хелаторы эссенциальных металлов; кожа; кератиноциты; индекс пролиферации; индекс апоптоза.

Для цитирования: Николаева Т.В., Полякова В.С., Сетко Н.П., Воронина Л.Г. Соотношение процессов клеточной пролиферации и апоптоза в коже при воздействии солей тяжелых металлов и хелаторов эссенциальных металлов. *Гигиена и санитария*. 2017; 96(7): 690-694. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-7-690-694>

Для корреспонденции: Николаева Татьяна Владимировна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры дерматовенерологии ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, 460000, Оренбург. E-mail: orenderma@yandex.ru

Nikolaeva T.V., Polyakova V.S., Setko N.P., Voronina L.G.

RATIO OF PROCESSES OF CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN THE SKIN UNDER EXPOSURE TO HEAVY METAL SALTS AND CHELATORS OF ESSENTIAL METALS

Orenburg State Medical University, Orenburg, 460000, Russian Federation

In the model experiment on C57BL/6 mice there were established features of the impact of heavy metals and chelators of essential metals on proliferation and apoptosis of epithelial skin cells (keratinocytes). For the execution of a study 40 test animals were divided into seven experimental and 1 control groups, each consisted of five animals. The proliferative and apoptotic activity of keratinocytes was determined by the immunohistochemical method and evaluated by calculating the proliferation index and the index of apoptosis in the cells of the surface epithelium and the epithelial cells of hair follicles in the late anagen stage. Comparative analysis of the proliferation index of the control group and experimental groups showed administration of zinc sulfate, sodium dichromate and zinc chelator (N, N, N', N'-tetraakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine) to animals to give rise in a statistically significant increase in the proliferative activity of keratinocytes. The decline of proliferation index was detected in animals treated with lead acetate and copper chelator (ammonium tetrathiomolybdate). Introduction of an iron chelator (deferoxamine) had no effect on the proliferative activity of keratinocytes in experimental animals. Induction of apoptosis of epithelial cell was noted under the administration of nickel sulfate, sodium dichromate, lead acetate and zinc chelator (N, N, N', N'-tetraakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine) to animals. In mice received deferoxamine zinc sulfate and apoptotic activity of keratinocytes has not changed. The use of cluster analysis allowed to classify substances administered to experimental animals, taking into account their simultaneous effect on the studied cellular processes. Lead acetate, iron chelator (deferoxamine) and copper chelator (ammonium tetrathiomolybdate) were shown to reduce the proliferative activity of keratinocytes and have little effect on apoptosis of the epithelial cells of the skin. Zinc sulfate,

nickel sulfate, sodium dichromate and zinc chelator (N, N, N', N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine) activate cell proliferation and induce apoptosis of keratinocytes.

Key words: *heavy metals; chelators of essential metals; skin; keratinocytes; proliferation index; apoptosis index.*

For citation: Nikolaeva T.V., Polyakova V.S., Setko N.P., Voronina L.G. Structural and functional reorganization of the skin and its derivatives in experimental subacute intoxication with heavy metals salts. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2017; 96(7): 690-694. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-7-690-694>

For correspondence: Tatyana V. Nikolaeva, MD, PhD, associate Professor of the Department of dermatology of the Orenburg State Medical University, Orenburg, 460000, Russian Federation. E-mail: orenderma@yandex.ru.

Information about authors:

Nikolaeva T.V. <http://orcid.org/0000-0003-2514-6332>; Polyakova V. S. <http://orcid.org/0000-0003-4100-3630>; Setko N. P. <http://orcid.org/0000-0001-6698-2164>; Voronina L. G. <http://orcid.org/0000-0003-4834-8324>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received 21.04.16

Accepted 05.07.17

Введение

Известно, что тканевой гомеостаз определяется балансом между процессами пролиферации и апоптоза [1, 2]. Особую роль в их регуляции играют эссенциальные металлы, такие как цинк, железо и медь [3]. В экспериментальных работах, преимущественно выполненных на модели грызунов, установлено модулирующее действие на пролиферацию и апоптоз клеток различных органов и других металлов, включая токсичные никель, хром и свинец [4–7]. Однако особенности пролиферативной активности и апоптоза эпителиальных клеток кожи и ее придатков при воздействии металлов, поступающих в живые организмы энтеральным путем, в доступной научной литературе не представлены.

Материал и методы

Экспериментальное исследование влияния токсичных металлов и хелаторов эссенциальных металлов на пролиферативную и апоптотическую активность эпителиальных клеток кожи (кератиноцитов) выполнено на примере инбредной линии мышей C57BL/6. Животные этой линии являются стандартизованной моделью для изучения фолликула волоса, отличаются строгой синхронизацией цикла развития волосяного фолликула [8] и возможностью путем депиляции инициировать синхронный анаген (фазу роста волосяного фолликула), неотличимый от спонтанно развивающегося [9]. Волосяной фолликул в стадии анагена характеризуется процессами пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, а у мышей линии C57BL/6 также меланогенезом [8]; в связи с этим он является высокочувствительным для различных воздействий мини-органом [8], что позволяет дать более полную характеристику изменениям кератиноцитов в эксперименте.

Для проведения исследования 40 мышей-самцов в возрасте 6–7 недель с исходной массой 15–17 г были распределены на семь опытных и контрольную группу по 5 особей в каждой. Экспериментальные животные I опытной группы в качестве питьевой воды получали водный раствор сульфата цинка (0,1238 г/л; 50 мг/л в пересчете на цинк); II опытной группы – водный раствор сульфата никеля (0,0026 г/л; 1 мг/л в пересчете на никель); III опытной группы – водный раствор бихромата натрия двухосновного (0,001433 г/л; 0,5 мг/л в пересчете на хром); IV опытной группы – водный раствор ацетата свинца (трехводный) (0,00054 г/л; 3 мг/л в пересчете на свинец). Хелатор железа дефероксамин (Novartis Farma S.p.A., Италия) вводили животным V опытной группы внутривенно в дозе 100 мг/кг ежедневно [10]. Хелатор меди тетраиомолибдат аммония (ТТМ) (Sigma, США) вводили мышам VI опытной группы перорально через зонд ежедневно в дозе 30 мг/кг [11]. Хелатор цинка N,N,N',N'-тетраakis(2-пиридилметил)-этилендиамин (ТПЭН) (Sigma, США) инъектировали животным VII опытной группы в дозе 8 мг/кг ежедневно, при этом в качестве растворителя выступала транспортная среда, состоявшая из этанола, глицерина и воды, взятых в соотношении 1:3:6 [12].

На 17-й день эксперимента животным всех групп под эфирным наркозом была проведена индукция анагена путем депиляции волос с кожи спины [9] восковыми мини-полосками WaxStrips Beauty Formulas (Drammock International Ltd, Великобритания). На 9-е сутки после депиляции, соответствовавшие

позднему анагену [8], все животные были выведены из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом.

Морфологическому исследованию подлежали образцы кожи, ранее подвергнутой депиляции. Отбор исследуемого материала проводили с межлопаточной области, паравerteбрально, начиная от линии, соединяющей основания лопаток экспериментальных животных. Образцы кожи размером 10,0 · 15,0 мм после забора помещали в 10%-й нейтральный формалин и фиксировали при комнатной температуре в течение суток, затем после стандартной гистологической проводки заливали в парафин. Эксперимент проводился с разрешения локального этического комитета ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 131 от 15.12.2015), с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных»¹ и «Правил лабораторной практики в Российской Федерации»².

Пролиферативную и апоптотическую активность кератиноцитов определяли иммуногистохимическим методом на гистологических срезах кожи толщиной 5 мкм и оценивали путем расчета индекса пролиферации (ИП) и индекса апоптоза (ИА). Выявление пролиферирующих эпителиальных клеток, основанное на экспрессии их ядрами белка Ki-67 [13], проводили с использованием кроличьих моноклональных антител к Ki-67 (clone SP6) (Cell Marque, США) с визуализацией Ki-67-позитивных клеток согласно протоколу фирмы-производителя. Апоптотические клетки выявлялись путем идентификации каспазы-3 – раннего маркера апоптоза [14], который экспрессируется клетками всех тканей [15]. Выявление экспрессирующих каспазу-3 эпителиальных клеток выполнено с использованием первичных антител Human CPP 32 (caspase-3) Clone JHM62 согласно протоколу фирмы-производителя (Spring Bioscience, США). Подсчет клеток проводили не менее чем в 15 полях зрения при увеличении ×600. Ki-67-позитивные клетки распознавали по наличию ядра коричневого цвета, каспаза-3-позитивные – по темно-коричневой зернистости в ядре и цитоплазме. Оценивали клетки покровного эпителия и эпителиальные клетки волосяных фолликулов – наружной и внутренней оболочек влагилица фолликула волоса, без учета зоны матрикса, где из-за скопления гранул меланина меченые ядра клеток трудно различимы. Для каждого поля зрения рассчитывали ИП и ИА, которые представляли собой отношение доли позитивно окрашенных клеток к общему количеству клеток, выраженное в процентах [15].

Данные для каждой группы представлены в виде средней арифметической и стандартной ошибки средней ($M \pm m$) и 95%-го доверительного интервала (ДИ). Сравнение данных каждой из опытных групп с контролем проведено с помощью критерия Манна–Уитни (1947). В том случае, если ДИ для средних значений сравниваемых показателей имели трансгрессию, различия между ними считали статистически незначимыми [16].

Количественная оценка меры сходства (различия) каждой опытной группы с контрольной по двум одинаково важным признаками (пролиферация и апоптоз кератиноцитов), не коррелированным между собой (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,19$; $p > 0,05$), проведена путем расчета евклидова расстоя-

¹ Утверждены приказом МЗ СССР от 12.08.1977 № 755.

² Утверждены приказом МЗ РФ от 19.06.2003 № 267.

Таблица 1

Индексы пролиферации и апоптоза эпителиальных клеток кожи мышей контрольной и опытных групп

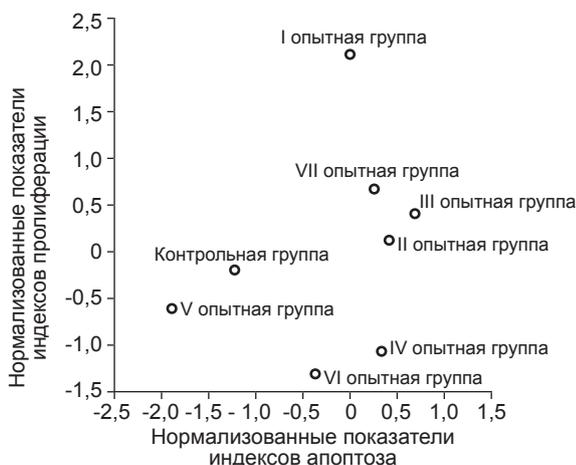
Группа	Индексы пролиферации (%)			Индексы апоптоза (%)		
	$M \pm m$	95%-й ДИ	p	$M \pm m$	95%-й ДИ	p
Контрольная	10,1 ± 0,33	9,39–10,95	–	3,2 ± 0,22	2,67–3,73	–
I опытная	18,57 ± 0,34	17,68–19,4	0,002*	4,4 ± 0,32	3,56–5,24	0,03
II опытная	11,48 ± 0,25	10,82–12,1	0,02	5,3 ± 0,21	4,79–5,87	0,002*
III опытная	12,65 ± 0,29	11,89–13,4	0,002*	5,5 ± 0,22	4,92–6,07	0,002*
IV опытная	7,14 ± 0,21	6,55–7,72	0,004*	5,2 ± 0,37	4,16–6,23	0,006*
V опытная	8,7 ± 0,29	8,02–9,54	0,03	2,5 ± 0,22	1,92–3,07	0,04
VI опытная	6,11 ± 0,14	5,74–6,48	0,002*	4,5 ± 0,22	3,92–5,07	0,008*
VII опытная	13,51 ± 0,15	13,23–13,7	0,002*	4,66 ± 0,3	3,80–5,52	0,008*

яния (EP) [17]. Чем больше расстояние между контрольной и каждой из опытных групп, тем существеннее различие между ними [17]. EP рассчитывалось на основе средних значений ИП и ИА для каждой группы, которые с учетом различий в дисперсиях показателей (дисперсия показателя ИП в 10 раз больше, чем показателя ИА) были предварительно стандартизованы путем нормирования и центрирования.

Для оценки качественных различий между контрольной группой и каждой из опытных групп, обусловленных разнотипным влиянием отдельных металлов на процессы клеточной пролиферации и апоптотической гибели эпителиальных клеток кожи, использовали иерархический (правило объединения по методу Варда) и итерационный (метод К-средних) кластерный анализ [18]. Кластерный анализ проведен на основе показателей ИП и ИА, рассчитанных для каждого из проанализированных микропрепаратов исследуемых групп, предварительно стандартизованных путем нормирования и центрирования. Дальнейший анализ данных выполнялся по фактическим средним показателям ИП и ИА для каждого кластера и контрольной группы. Для сравнения данных трех групп – контрольной группы и кластеров – использовали критерий Краскела–Уоллиса (H) (1952) с последующим сравнительным анализом каждого из кластеров и контрольной группы по критерию Манна–Уитни (U) (1947) [16]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ при условии отсутствия трансгрессии 95% ДИ. Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи таблиц Excel, программы Statistica 10.0.

Результаты

Анализ данных, приведенных в табл. 1, показал, что поступление в организм экспериментальных животных I опытной группы сульфата цинка привело к достоверному увеличению ИП эпителиальных клеток кожи в 1,8 раза по сравнению



Евклидовы расстояния между контрольной и опытными группами.

с контрольным показателем. Аналогичный результат получен у экспериментальных животных VII опытной группы, получавших хелатор цинка (ТПЭН), показатель ИП кератиноцитов у мышей этой группы в 1,3 раза выше, чем в контроле. Введение экспериментальным животным VI опытной группы хелатора меди (ТТМ) привело к статистически значимому снижению ИП до уровня в 1,65 раза ниже контрольного.

Значимое влияние на пролиферативную активность кератиноцитов оказало поступление в организм мышей III опытной группы бихромат натрия. У экспериментальных животных этой группы отмечено увеличение ИП эпителиальных клеток в исследуемом материале в 1,25 раза по сравнению с показателем контрольной группы. При потреблении раствора ацетата свинца наблюдался противоположный эффект: в IV опытной группе, животные которой получали раствор этого соединения, выявлено снижение показателя ИП эпителиоцитов кожи в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой. Поступление в организм мышей II опытной группы сульфата никеля и V опытной группы хелатора железа (дефероксамин) значимого влияния на пролиферативную активность эпителиоцитов кожи не оказало.

Выявлено изменение апоптотической активности кератиноцитов при введении солей тяжелых металлов и хелаторов эссенциальных металлов. Установлено, что результатом поступления в организм мышей III опытной группы бихромата натрия, II опытной группы сульфата никеля и IV опытной группы ацетата свинца явилось статистически значимое увеличение ИА кератиноцитов соответственно в 1,7 раза, в 1,65 раза и в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой. Введение экспериментальным животным VI опытной группы хелатора меди (ТТМ) привело к увеличению ИА в 1,4 раза по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Аналогично воздействие хелатора цинка (ТПЭН), применение которого у мышей VII опытной группы привело к увеличению ИА в эпителиальных клетках кожи в 1,45 раза по сравнению с показателем контрольной группы ($p < 0,01$).

В качестве меры различия кератиноцитов мышей опытных групп и контрольной группы использовано EP, рассчитанное с учетом показателей ИП и ИА. На рисунке расположено групп определяется нормализованными показателями ИП, отмеченными на оси ординат, и ИА, отмеченными на оси абсцисс. Чем больше EP между группами, тем существеннее различия между ними по исследуемым показателям. Результаты расчета EP между контрольной и опытными группами упорядочены по убыванию и образуют следующую последовательность: I опытная группа, получавшая сульфат цинка (EP = 2,52); III опытная группа, получавшая бихромат натрия (EP = 2,41); II опытная группа, получавшая сульфат никеля (EP = 2,19); IV опытная группа, получавшая ацетат свинца (EP = 2,17); VII опытная группа, получавшая ТПЭН (EP = 1,72); VI опытная группа, получавшая ТТМ (EP = 1,70); V опытная группа, получавшая дефероксамин (EP = 0,9).

В целях классификации вводимых веществ по их влиянию на пролиферативную и апоптотическую активность кератиноцитов мышей был проведен кластерный анализ, в основе которого лежали данные ИП и ИА кератиноцитов животных опытных и контрольной групп. В разделение на кластеры внесли вклад как показатель ИП ($F = 85,9$; $p < 0,001$), так и показатель ИА ($F = 8,7$; $p = 0,005$). Эти показатели в кластерах и контрольной группе статистически значимо различаются между собой: для признака, характеризующего ИП, $p < 0,001$; для признака, характеризующего ИА, $p = 0,0004$.

Анализ данных, приведенных в табл. 2, показал, что 1-й кластер, объединяющий три группы экспериментальных животных, получавших ацетат свинца, дефероксамин и ТТМ, характеризуется низким по сравнению с контролем ИП (снижение в 1,37 раза; $p < 0,001$) при отсутствии различий по ИА. Во 2-м кластере, объединяющем четыре группы экспериментальных животных, получавших сульфат цинка, сульфат никеля, бихромат натрия и ТПЭН, ИП и ИА превышают значения контрольной группы в 1,39 раза и в 1,55 раза соответственно (в обоих случаях $p < 0,001$).

Обсуждение

Полученные в настоящем исследовании результаты, свидетельствующие о повышении пролиферативной активности кератиноцитов у экспериментальных животных, получавших сульфат цинка, согласуются с результатами, полученными X. Kang и соавт. (2008) [19]. Они объясняются тем, что цинк является структурным и функциональным компонентом факторов транскрипции и внутриклеточного сигнального пути, связанного с регулированием клеточной пролиферации [20].

Введение мышам хелатора цинка (ТПЭН) также привело к увеличению ИП эпителиальных клеток кожи. Это противоречит имеющимся в литературе сведениям, показывающим, что обработка клеточных культур ТПЭН ингибирует клеточную пролиферативную активность [21, 22]. Выявленные различия по данным, полученным в модельном эксперименте на животных и на примере культуры клеток, вероятно, объясняются возникающими в организме адаптивными реакциями в ответ на изменение внутриклеточной концентрации цинка, которые невозможны в клеточных культурах. Предполагается, что цинк и медь при дефицитных состояниях могут стать функциональной заменой друг друга [23]. Возможным механизмом стимуляции пролиферации эпителиальных клеток кожи при введении мышам ТПЭН является компенсаторное поступление меди в эпителиоциты кожи в ответ на внутриклеточный дефицит цинка, формирующийся при введении хелатора этого металла. При этом, вероятно, медь стимулирует пролиферацию клеток, активируя медь-зависимые транскрипционные факторы [3], в частности Atox-1 [24].

Участие меди в пролиферативном процессе эпителиальных клеток кожи косвенно подтверждается полученными в настоящем исследовании данными, показывающими, что при введении экспериментальным животным хелатора этого металла (ТТМ) происходит статистически значимое снижение ИП. Известно, что низкие внутриклеточные концентрации меди приводят к удлинению периода пролиферации клеток, в ряде случаев несовместимы с пролиферативным процессом [3].

В проведенном эксперименте установлено увеличение ИП кератиноцитов у животных, получавших бихромат натрия. Это согласуется с имеющимися в литературе сведениями об увеличении пролиферативного ответа эпителиальных клеток, выступающих дыхательные пути мышей, подвергшихся воздействию раствора хромата цинка [25]. Известно, что соединения шестивалентного хрома приводят к оксидативному стрессу, повреждению ДНК, нарушению клеточного цикла и метаболизма клетки [25], что, возможно, является причиной компенсаторного роста пролиферативной активности.

Влияние ацетата свинца на пролиферацию эпителиальных клеток кожи противоположно эффекту солей цинка и хрома и характеризуется снижением ИП кератиноцитов. Результаты отдельных исследований, выполненных на примере культуры клеток, обрабатываемых соединениями свинца [26], также свидетельствуют об ингибировании клеточной пролиферации, что, возможно, обусловлено нарушением белкового синтеза [26].

Воздействие солей тяжелых металлов и хелаторов эссенциальных металлов приводит к изменению апоптотической активности эпителиальных клеток кожи экспериментальных животных. Выявленное в настоящем исследовании увеличение ИА кератиноцитов при поступлении в организм экспериментальных животных сульфата никеля, бихромата натрия и ацетата свинца согласуется с результатами ряда авторов [4–7, 27]. Соединения хрома, никеля, свинца являются цитотоксическими и генотоксичными [25], что опосредовано разнообразными механизмами, среди которых активация производства активных форм кислорода, оксидативный стресс и повреждение ДНК [28]. Возможно, апоптоз является способом устранения клеток с поврежденной соединением токсичных металлов ДНК [2].

Результатом введения экспериментальным животным хелатора меди (ТТМ) явилась активация апоптоза кератиноцитов. Это противоречит результатам исследования R.I. Bustos и соавт. (2013), которые сообщают об отсутствии влияния дефицита

Индексы пролиферации и апоптоза для кластеров и контрольной группы

Кластер/ группа	Индекс пролиферации, %			Индекс апоптоза, %		
	$M \pm m$	95%-й ДИ	p	$M \pm m$	95%-й ДИ	p
1-й кластер (опытные группы IV, V, VI)	7,35 \pm 0,3	6,70–8,01	0,0004*	4,0 \pm 0,32	3,32–4,7	0,17
2-й кластер (опытные группы I–III, VII)	14,05 \pm 0,57	12,86–15,25	0,00008*	4,97 \pm 0,16	4,64–5,3	0,0001*
Контрольная группа	10,1 \pm 0,33	9,39–10,95	–	3,20 \pm 0,22	2,67–3,73	–

меди на запрограммированную клеточную гибель [29]. Однако у мышей линии C57BL/6 анаген ассоциирован с меланогенезом, который сопровождается клеточным окислительным стрессом [30] и, вероятно, увеличивает потребности меланоцитов в синтезе антиоксидантов, таких как Cu/Zn-супероксиддисмутаза, где основным кофактором, обуславливающим ее антиоксидантную роль, является медь [31].

В настоящем исследовании установлено, что введение хелатора цинка (ТПЭН) мышам также приводит к активации апоптоза кератиноцитов. Полученные данные согласуются с результатами исследования F. Chai и соавт. (2000) [32] и объясняются тем, что снижение внутриклеточной концентрации цинка приводит к повреждению митохондрий, активации каспаз, в первую очередь каспазы-3, и апоптозу [35].

Количественной мерой различий пролиферативной и апоптотической активности кератиноцитов мышей контрольной и опытных групп стало рассчитанное ЕР. Данные, представленные на рисунке, показывают, что наиболее удаленной от контрольной группы является I опытная группа, где экспериментальные животные получали сульфат цинка. Это свидетельствует о том, что наибольшее воздействие на анализируемые клеточные процессы оказывает поступление сульфата цинка, в основном за счет выраженного повышения пролиферативной активности (ИП I опытной группы на 83,86% выше ИП контрольной группы). Наиболее близко к контрольной группе располагается V опытная группа, получавшая дефероксамин, введение этого хелатора железа не изменило пролиферативной и апоптотической активности кератиноцитов экспериментальных животных.

Отмечено, что на почти равном удалении от контрольной группы находятся II опытная группа, получавшая сульфат никеля, и IV опытная группа, животные которой потребляли раствор ацетат свинца. Однако сульфат никеля и ацетат свинца оказывают одинаковое влияние лишь на апоптоз, что выражается увеличением ИА соответственно на 65,6% и 62,5% от показателя в контрольной группе. При этом введение ацетата свинца снижает пролиферативную активность эпителиальных клеток кожи (ИП IV опытной группы на 29,3% 29,7% меньше, чем в контроле), на которую сульфат никеля не оказывает влияния.

Равноудалены от контрольной группы также VII опытная группа, которой вводили хелатор цинка (ТПЭН), и VI опытная группа, получавшая хелатор меди (ТТМ). Эти хелаторы индуцируют апоптоз кератиноцитов. ИА эпителиальных клеток кожи мышей VII и VI опытных групп выше показателя контрольной группы на 45,62; 40,6 и 40,62; 46,87% соответственно. Однако ТПЭН и ТТМ оказывают противоположное влияние на пролиферацию эпителиоцитов кожи. Если введение ТТМ приводит к снижению пролиферативной активности в исследуемом материале (ИП на 39,5% меньше, чем в контроле), то воздействие ТПЭН, напротив, увеличивает пролиферацию эпителиальных клеток кожи (ИП выше, чем контроле, на 33,76; 33,66%).

Следовательно, одинаковый результирующий эффект воздействия тяжелых металлов и хелаторов эссенциальных металлов, выражающийся равным удалением опытных групп от контрольной, является следствием разнонаправленного влияния действующих веществ на процессы пролиферации и апоптоза кератиноцитов.

Применение кластерного анализа позволило классифицировать вводимые экспериментальным животным вещества с учетом их одновременного влияния на исследуемые клеточные процессы. Показано, что ацетат свинца, хелатор железа (дефероксамин) и хелатор меди (ТТМ) снижают пролиферативную

активность кератиноцитов и оказывают незначительное влияние на апоптоз эпителиальных клеток кожи. Сульфат цинка, сульфат никеля, бихромат натрия и хелатор цинка (ПЭН) активируют клеточную пролиферацию и индуцируют апоптоз кератиноцитов. При этом рост пролиферативной активности кератиноцитов, вероятно, является компенсаторной реакцией на активацию апоптотической гибели эпителиальных клеток кожи.

Заключение

Тяжелые металлы и хелаторы цинка и меди нарушают тканевой гомеостаз в коже, что может явиться основой для нарушения барьерных свойств кожи и патогенетическим фактором патологических состояний, сопровождающихся дисбалансом между процессами пролиферации и апоптоза кератиноцитов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

(п.п. 3–12, 14, 16, 19–32 см. References)

1. Клишов А.А. *Гистогенез и регенерация тканей*. Ленинград: Медицина; 1984.
2. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1998; (2): 38–48.
3. Бабиченко И.И., Ковязин В.А. *Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста: Учебное пособие*. М.: РУДН; 2008.
4. Яровая Г.А., Нешкова Е.А., Мартынова Е.А., Блохина Т.Б. Роль протеолитических ферментов в контроле различных стадий апоптоза. *Лабораторная медицина*. 2011; (11): 39–53.
5. Айвазян С.А., Мхитарян С.А. *Прикладная статистика. Основы эконометрики: учебник для вузов: в 2 т. Т. 1: Теория вероятностей и прикладная статистика*. М.: ЮНИТИ-ДАНА; 2001.
6. Боев В.М., Борщук Е.Л., Екимов А.К., Бегун Д.Н. *Руководство по обеспечению решения медико-биологических задач с применением программы Statistica 10.0*. Оренбург: ИПК «Южный Урал»; 2014.

References

1. Klishov A.A. *Histogenesis and Tissue Regeneration [Gistogenez i regeneratsiya tkaney]*. Leningrad: Meditsina; 1984. (in Russian)
2. Yarilin A.A. Apoptosis. The nature of the phenomenon and its role in the whole organism. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 1998; (2): 38–48. (in Russian)
3. Peled T., Landau E., Prus E., Treves A.J., Nagler A., Fibach E. Cellular copper content modulates differentiation and self-renewal in cultures of cord blood-derived CD34+ cells. *Br. J. Haematol.* 2002; 116(3): 655–61.
4. Garcia-Rodríguez Mdel C., Carvente-Juárez M.M., Altamirano-Lozano M.A. Antigenotoxic and apoptotic activity of green tea polyphenol extracts on hexavalent chromium-induced DNA damage in peripheral blood of CD-1 mice: analysis with differential acridine orange/ethidium bromide staining. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013; 2013: 486419.
5. Su L., Deng Y., Zhang Y., Li C., Zhang R., Sun Y., et al. Protective effects of grape seed procyanidin extract against nickel sulfate-induced apoptosis and oxidative stress in rat testes. *Toxicol. Mech. Methods.* 2011; 21(6): 487–94.
6. Tang K., Guo H., Deng J., Cui H., Peng X., Fang J., et al. Inhibitive effects of nickel chloride (NiCl₂) on thymocytes. *Biol. Trace Elem. Res.* 2015; 164(2): 242–2.
7. Quan F.S., Yu X.F., Gao Y., Ren W.Z. Protective effects of folic acid against central nervous system neurotoxicity induced by lead exposure in rat pups. *Genet. Mol. Res.* 2015; 14(4): 12466–71.
8. Müller-Röver S., Handjiski B., van der Veen C., Eichmüller S., Foitzik K., McKay I.A., et al. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 117(1): 3–15.
9. Paus R., Handjiski B., Eichmüller S., Czarnetzki B.M. Chemotherapy-induced alopecia in mice. Induction by cyclophosphamide, inhibition by cyclosporine A, and modulation by dexamethasone. *Am. J. Pathol.* 1994; 144(4): 719–34.
10. Zhang Y., Zhang Y., Xie Y., Gao Y., Ma J., Yuan J., et al. Multitargeted inhibition of hepatic fibrosis in chronic iron-overloaded mice by *Salvia miltiorrhiza*. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 148(2): 671–81.

11. Wei H., Frei B., Beckman J.S., Zhang W.J. Copper chelation by tetrathiomolybdate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011; 301(3): H712–20.
12. Fukuyama S., Matsunaga Y., Zhanghui W., Noda N., Asai Y., Moriwaki A., et al. A zinc chelator TPEN attenuates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice in vivo. *Allergol. Int.* 2011; 60(3): 259–66.
13. Babichenko I.I., Kovyazin V.A. *New Methods of Immunohistochemical Diagnostic of Tumor Growth: Textbook [Novye metody immunogistokhimicheskoy diagnostiki opukhlevogo rosta: Uchebnoye posobie]*. Moscow: RUDN; 2008. (in Russian)
14. Earnshaw W.C., Martins L.M., Kaufmann S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1999; 68: 383–424.
15. Yarovaya G.A., Neshkova E.A., Martynova E.A., Blokhina T.B. The role of the proteolytic enzyme in the control of different stages of apoptosis. *Laboratornaya meditsina*. 2011; (11): 39–53. (in Russian)
16. Glantz S.A. *Primer of Biostatistics*. 5th edition. New York: McGraw-Hill; 2002.
17. Ayvazyan S.A., Mkhitarjan S.A. *Applied Statistics. Basics of Econometrics: Textbook for Institutes of Higher Education: in 2 Vol. Vol. 1: Probability Theory and Applied Statistics [Prikladnaya statistika. Osnovy ekonometriki: uchebnik dlya vuzov: v 2 t. T. 1: Teoriya veroyatnostey i prikladnaya statistika]*. Moscow: YUNITI-DANA; 2001. (in Russian)
18. Boev V.M., Borshchuk E.L., Ekimov A.K., Begun D.N. *Guidelines for solving medical-biological problems using the program Statistica 10.0*. Orenburg: ИПК «Yuzhnyy Ural»; 2014. (in Russian)
19. Kang X., Song Z., McClain C.J., Kang Y.J., Zhou Z. Zinc supplementation enhances hepatic regeneration by preserving hepatocyte nuclear factor-4alpha in mice subjected to long-term ethanol administration. *Am. J. Pathol.* 2008; 172(4): 916–25.
20. Azman M.S., Wan Saudi W.S., Ilhami M., Mutalib M.S., Rahman M.T. Zinc intake during pregnancy increases the proliferation at ventricular zone of the newborn brain. *Nutr. Neurosci.* 2009; 12(1): 9–12.
21. Kang M., Zhao L., Ren M., Deng M., Li C. Reduced metallothionein expression induced by Zinc deficiency results in apoptosis in hepatic stellate cell line LX-2. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(11): 20603–9.
22. Shen H., Qin H., Guo J. Cooperation of metallothionein and zinc transporters for regulating zinc homeostasis in human intestinal Caco-2 cells. *Nutr. Res.* 2008; 28(6): 406–13.
23. Hashemi M., Ghavami S., Eshraghi M., Booy E.P., Los M. Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 557(1): 9–19.
24. Itoh S., Kim H.W., Nakagawa O., Ozumi K., Lessner S.M., Aoki H., et al. Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(14): 9157–67.
25. Beaver L.M., Stemmy E.J., Schwartz A.M., Damsker J.M., Constant S.L., Ceryak S.M., et al. Lung inflammation, injury, and proliferative response after repetitive particulate hexavalent chromium exposure. *Environ. Health Perspect.* 2009; 117(12): 1896–902.
26. Sarkar A., Chattopadhyay S., Kaul R., Pal J.K. Lead exposure and heat shock inhibit cell proliferation in human HeLa and K562 cells by inducing expression and activity of the heme-regulated eIF-2alpha kinase. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 2002; 6(6): 391–6.
27. Zhang J., Cao H., Zhang Y., Zhang Y., Ma J., Wang J., et al. Nephroprotective effect of calcium channel blockers against toxicity of lead exposure in mice. *Toxicol. Lett.* 2013; 218(3): 273–80.
28. Rana S.V. Metals and apoptosis: recent developments. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2008; 22(4): 262–84.
29. Bustos R.I., Jensen E.L., Ruiz L.M., Rivera S., Ruiz S., Simon F., et al. Copper deficiency alters cell bioenergetics and induces mitochondrial fusion through up-regulation of MFN2 and OPA1 in erythropoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 437(3): 426–32.
30. Jimenez-Cervantes C., Martinez-Esparza M., Perez C., Daum N., Solano F., Garcia-Borron J.C. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. *J. Cell Sci.* 2001; 114(12): 2335–44.
31. Osredkar J., Sustar N. Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J. Clin. Toxicol.* 2011; S3.
32. Chai F., Truong-Tran A.Q., Evdokiou A., Young G.P., Zalewski P.D. Intracellular zinc depletion induces caspase activation and p21 Waf1/Cip1 cleavage in human epithelial cell lines. *J. Infect. Dis.* 2000; 182(1): S85–92.