

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕМБРІОТОКСИЧНОСТІ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ ТА НАНОЗОЛОТА

Державний заклад Дніпропетровська медична академія (м. Дніпропетровськ)

Дане дослідження є фрагментом міжкафедральної планової наукової теми Державного закладу «Дніпропетровська медична академія» МОЗ України «Розвиток та морфофункціональний стан органів і тканин експериментальних тварин та людини в нормі, в онтогенезі, під впливом зовнішніх чинників», № державної реєстрації 0111U012193.

Вступ. Як свідчать дослідження останніх років, у XXI столітті прогрес нанонауки буде значно впливати на розвиток техніки, фізики, хімії, біології, сільського господарства, фізіології, біохімії, медицини, фармакології, фармації, ветеринарії, а також на економічне, політичне і соціальне сьогодення. Вивчення властивостей наноматеріалів сприяло встановленню надзвичайно цікавого факту – перехід технологій від „мікро” до „нано” – це якісно нові матеріалами з новими фізичними, хімічними, біологічними характеристиками. Перед вченими світу зараз стоїть завдання розробити високопродуктивні, економічно вигідні та безпечні для людини, тварин та довкілля технології отримання наноматеріалів. Застосування останніх для діагностики, профілактики й лікування різних захворювань матиме важливе не тільки медичне, але і соціально-гуманітарне значення з урахуванням біоетичних аспектів вивчення механізму їх дії з застосуванням нових токсикологічних принципів, методів і показників [4, 5].

Серед сучасних досліджень з нанобіотехнологій зовсім незначна їх частина присвячена дослідженню впливу тих чи інших нанопродуктів на ембріогенез та органогенез. За даними науково-медичної інформації вплив на загальний хід ембріогенезу та на розвиток окремих органів останнім часом досліджується все більше. За даними літератури експериментально визначено токсичні та терапевтичні дози деяких речовин, але на сьогоднішній день не вивченими залишаються дози, що є токсичними для ембріонів, а також невиявленими є спектр вад розвитку, що виникають під дією того чи іншого нанопродукту [2, 6, 7, 12]. Аналіз джерел за визначеною тематикою виявив досить незначну кількість робіт, присвячених дослідженням впливу нанопродуктів на процес запліднення та ембріогенез.

Вітчизняні дослідники вивчали тератогенні ефекти різних класів наноматеріалів протягом ембріогенезу [2]. Матеріалом були обрані ембріони курки, а вплив проводили трьома класами наноматеріалів: природними, антропогенно-мимовільними та антропогенно-нарочитими. Вченими виявлено односкерований тератогенний вплив на курячі ембріони

представників наноматеріалів всіх трьох класів. В цілому дослідники спостерігали затримку або зупинку розвитку зародка на ранніх стадіях і значні деструктивні зміни в його тканинах, хоча ступінь вираженості цих змін відрізнявся для кожного класу наноматеріалів. Найбільшу руйнівну силу, на думку авторів, мають антропогенно-нарочиті наноматеріали, вони призводили до незворотних змін у розвитку ембріону і викликали некробіози та некрози тканин [2, 11]. Але ми не зустріли наукових робіт по впливу нанометалів на хід ембріогенезу плацентарних тварин. Не визначеними залишаються також механізм та терміни максимального впливу нанопродуктів на розвиток ембріона в цілому, або окремих органів і систем. Особлива увага приділяється таким пріоритетним металам як золото, залізо, срібло, цинк. Колоїдне золото та срібло відомо ще з давніх-давен і використовувалося в лікувальних цілях. Здатність золота регулювати експресію протизапальних генів, зв'язувати переокисні радикали, пригнічувати розвиток злоякісних клітин [5, 9], викликає інтерес сучасних дослідників. В зв'язку з цим для медиків постає низка питань доставки золота до клітин або органам-мішеням. Механізм дії сполук золота до кінця не ясний, проте в даний час відомо, що золото може входити до складу металопротеїнів, взаємодіяти з міддю, може залучатися до процесів зв'язування гормонів в тканинах. Токсичні ефекти золота зазвичай пов'язані з передозуванням або побічними ефектами при застосуванні його солей в терапії ревматоїдних артритів. При цьому серед учених не вщухають суперечки з приводу їх можливої токсичності і здатності викликати мутації [6, 9, 12].

Увага дослідників головним чином зосереджена на вивченні біологічних ефектів впливу нанометалів на клітинному рівні [11, 13, 14]. Однак, незважаючи на інтенсивні дослідження останніх років, відомості щодо ефектів впливу наночастинок металу на організм та на ембріон є досить обмеженими і суперечливими. Щодо токсичності наночастинок золота також існують суперечливі дані. Одне з центральних місць в сучасних дослідженнях посідають також вияви морфологічних змін та вад розвитку організму, що виникають внаслідок дії різних факторів, в тому числі і негативного впливу екологічної обстановки або лікарських засобів, солей важких металів [2, 3, 9].

Для промислових областей України проблема забруднення важкими металами особливо актуальна. При цьому, пріоритетним токсикантом є свинець

та його сполуки. Дослідження впливу на розвиток того чи іншого органу у ембріона після впливу на організм матері такими тератогенами як, наприклад, ацетат свинцю далеке від завершення. Пошук можливих антагоністів дії токсикантів теж важлива задача сучасної науки.

Аналіз даних світової наукової літератури на предмет можливого тератогенного впливу важких металів та нанометалів на організм довів доцільність проведення експериментальних робіт в зазначеному напрямку.

Метою дослідження було моделювання ембріотоксичного впливу ацетату свинцю при ізольованому введенні та в комбінації з нанозолотом, а також пошук нових біоантогоністів свинцю.

Об'єкт і методи дослідження. Матеріалом експериментального дослідження було обрано щурів. Вибір об'єктом дослідження саме цих лабораторних тварин зумовлений низьким рівнем у них спонтанних вад розвитку (0,02-0,85%) порівняно з мишами (0,04-15,7%) та кролями (0,74-4,2%). Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Перед початком експерименту всі тварини були оглянуті, зважені, враховувався їхній вік, рухова активність та стан шкіри. Під час спостереження лабораторні тварини утримувались в звичайних умовах віварію ДЗ «ДМА». Годування, пересаджування тварин, зміна підстилки, миття кліток, прибирання приміщень проводилось з дотриманням стандартних умов. Експериментальна частина роботи виконана на 20 білих статевозрілих щурах-самицях лінії Вістар вагою 180-200 грамів.

В експериментальних моделях використовували розчини ацетату свинцю та цитрату золота, отриманого за аквананотехнологією [8]. Моделювання впливу розчинів нанометалів на організм самиці та на ембріогенез у щурів проводили шляхом введення розчинів металів та нанометалів через зонд один раз на добу, в один і той же час, з 1 по 19 день вагітності. Було сформовано 3 експериментальних групи тварин: 1 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05мг/кг; 2 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05мг/кг та розчин нанозолота у дозі 1,5 мкг/кг; 3 група – контрольна.

Дослідних тварин виводили з експерименту способом передозування ефірного наркозу після вилучення матки з ембріонами. Щурят вилучали з матки, перевіряли на тест живі-загиблі, зважували, фотографували та фіксували у 10% розчині формаліну

для подальшого гістологічного дослідження. В роботі застосований комплексний підхід з використанням фізіологічних і морфологічних методів дослідження: **Фізіологічні методи** (контроль приросту маси тіла, визначення строків настання статевого дозрівання, спостереження за статевим циклом (вагінальні мазки на визначення стадії еструсу) і статевою поведінкою. **Морфологічні методи:** макроскопічні (макроскопічний опис органів, органометричні методи) – для вивчення можливих змін на організмі рівні та наступні мікроскопічні дослідження. Показниками ембріотоксичності служать: перед-і постімплантаційна ембріональна смертність, морфологічні (анатомічні) вади розвитку, а так само загальна затримка розвитку плодів. Ембріотоксичну дію досліджуваних речовин оцінювали за наступними показниками:

1. Індекс плодовитості:

чисельність отриманих послідів
кількість спарених маток

2. Загальна ембріональна смертність (ЗСЕ)

$$ЗСЕ = \frac{B-A}{B} \times 100\%, \quad (1)$$

де А – кількість живих плодів

В – кількість жовтих тіл вагітності

3. Преімплантаційна смертність (ПІС)

$$ПІС = \frac{B-(A+B)}{B} - (\text{од.}) \quad (2)$$

де А – кількість живих плодів

В – кількість загиблих (резорбованих) плодів

В – кількість жовтих тіл вагітності

4. Постімплантаційна смертність (ПостІС)

$$\text{ПостІС} = \frac{B}{A+B} (\text{од.}) \quad (3)$$

де А – кількість живих плодів

В – кількість загиблих (резорбованих) плодів

5. Кількість плодів на 1 самку

Таблиця

Показники ембріонального розвитку експерименту

Показник	Контроль	Дослідні групи	
		ацетат свинцю	ацетат свинцю + нанозолото
Індекс плодовитості	0,8	0,9	0,8
Кількість тварин	8	8	8
Кількість живих плодів	72	60	92
Кількість живих плодів на 1 самицю	9,0±0,4	7,50±0,53*	11,50±0,93*, **
Кількість жовтих тіл вагітності	81	79	103
Кількість жовтих тіл вагітності на 1 самицю	10,13±0,53	9,88±0,53	12,88±1,06*, **
Маса тіла 1 плода, г	2,38±0,08	2,21±0,17	2,28 ±0,04
Загальна ембріональна смертність, %	11,11±4,43	24,05±1,33**	10,68±3,82***
Преімплантаційна смертність, од	0,10±0,05	0,23±0,06	0,11±0,10
Постімплантаційна смертність, од	0,01±0,01	0,02±0,02	-

Примітка: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; ° – p=0,05-0,1 по відношенню до контролю; °° – p<0,05; °°° – p<0,001; °° – p=0,05-0,1 по відношенню до групи з ацетатом свинцю.

Результати досліджень та їх обговорення.

Порівняння результатів ембріотропної дії низьких доз свинцю з показниками контрольної групи виявило його ембріотоксичність (табл.). Так, при практично однаковій кількості жовтих тіл вагітності спостерігається достовірне ($p < 0,05$) зниження кількості живих плодів на $17\% - 7,5 \pm 0,53$ проти $9,0 \pm 0,4$ контрольної групи відповідно. Така ситуація обумовлена збільшенням у 2,16 разів загальної ембріональної смертності ($p < 0,01$) за рахунок переважної їх смертності в доімплантаційний період ($p = 0,07$). При цьому зменшується не лише загальна кількість плодів, але і їх маса та розміри, хоча без достовірної різниці для даних масометричних показників.

Аналіз досліджуваних показників в групі, що отримувала комбінацію ацетату свинцю та наноаквахелату золота виявив покращення показників ембріонального розвитку порівняно з інтактною групою. Ми спостерігали достовірне підвищення кількості живих ембріонів на 1 самицю на $27,8\%$, підвищення кількості жовтих тіл вагітності на 27% , при практично однакових показниках загальної та доімплантаційної смертності та відсутності постімплантаційної смертності. Аналізуючи вагові показники проведеного експерименту, ми виявили незначне зниження маси тіла плодів – $2,38 \pm 0,08$ та $2,28 \pm 0,04$ відповідно в дослідній та контрольних групах (група інтоксикації – $2,21 \pm 0,17$).

Отже, при комбінованому введенні препаратів свинцю та нанозолота, не зважаючи на наявність ембріотоксичних проявів при ізольованому введенні свинцю, спостерігається покращення показників

ембріонального розвитку, що проявляється суттєвим – на $27-27,8\%$ збільшенням кількості жовтих тіл вагітності, кількості живих плодів на 1 самицю при практично однакових показниках загальної та доімплантаційної смертності.

При порівнянні показників ембріонального розвитку в групі, що отримувала ацетат свинцю в комбінації з нанозолотом з групою, що отримувала чистий препарат свинцю можна відзначити суттєве збільшення кількості живих плодів – на $53,3\%$ ($p < 0,001$), що обумовлено декількома факторами – збільшенням на $30,4\%$ ($p < 0,05$) жовтих тіл вагітності, зменшенням у 2,3 рази ($p < 0,001$) рівня загальної смертності за рахунок недостовірного зменшення доімплантаційної смертності у 2,1 разу та відсутності постімплантаційної смертності.

Висновок. Таким чином, при комбінованому введенні низьких доз свинцю та нанозолота спостерігається значне збільшення кількості жовтих тіл вагітності, кількості живих плодів. Вищенаведене дає підставу стверджувати, що введення цитратів наноаквахелатів золота на фоні інтоксикації ацетату свинцю попереджує негативний вплив останнього на процеси ембріонального розвитку плодів щурів в експериментальних умовах та свідчить про їх біоантагонізм.

Перспективи подальших досліджень. Актуальним та своєчасним є дослідження результатів впливу низьких доз свинцю та комбінація свинцю з нанобіометалами на паренхіматозні органи ембріонів.

Література

1. Верников В. М. Нанотехнологии в пищевых производствах: перспективы проблемы / В. М. Верников, Е. А. Арианова, И. В. Гмошинский [и др.] // Вопросы питания. – 2009. – Т. 78, № 2. – С. 4-17.
2. Глушкова А. В. Нанотехнологии и нанотоксикология – взгляд на проблему / А. В. Глушкова // Токсикологический вестник. – 2007. – № 6. – С. 4-8.
3. Гуліч М. П. Цитрат цинку, отриманий за аквананотехнологією: хімічна та біологічна характеристика (оцінка хімічної чистоти та біологічної доступності) / М. П. Гуліч [та ін.] // Довкілля та здоров'я. – 2011. – № 2. – С. 44-49.
4. Круцяк В. М. Значення ембріологічних досліджень на сучасному етапі розвитку морфологічної науки / В. М. Круцяк, В. І. Проняєв, Ю. Т. Ахтемійчук // Буковинський медичний вісник. – 1998. – Т. 2, № 1. – С. 3-7.
5. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії / В. Б. Борисевич, В. Г. Каплуненко, Косінов М. В. [та ін.] / Под ред. проф. В. Б. Борисевич, проф. В. Г. Каплуненко. – К.: ВД «Авіцена», 2010. – 416 с.
6. Патон Б. Нанонаука і нанотехнології: технічний, медичний та соціальний аспекти / Б. Патон, В. Москаленко, І. Чекман, Б. Мовчан // Вісник національної академії наук України. – 2009. – № 6. – С. 18-26.
7. Сердюк А. М. Нанотехнології мікронутрієнтів: проблеми, перспективи та шляхи ліквідації дефіциту макро- та мікроелементів / А. М. Сердюк, М. П. Гуліч, В. Г. Каплуненко, М. В. Косінов // Журнал Академії медичних наук України. – 2010. – Т. 16, №3. – С. 467-471.
8. Новинюк Л. В. Цитраты – безопасные нутриенты / Л. В. Новинюк // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 2009. – №3. – С. 70-71.
9. Сердюк А. М. Перспективы использования достижений нанотехнологии для решения проблемы дефицита микроэлементов в питании населения / А. М. Сердюк, М. П. Гуліч, В. Г. Каплуненко, Н. В. Косінов / Сб. Матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання та організаційно-правові засади співробітництва України та КНР у сфері високих технологій». – Київ, 2 червня 2009 р. – К., 2009. – С. 135-140.
10. Родимин В. Е. Способы введения наночастиц золота в биологическую ткань / В. Е. Родимин, А. В. Гегенава, Н. А. Державина, З. М. Гасанова // Вестник оториноларингологии. – 2006. – № 1. – С. 27-31.
11. Терещенко В. П. Медико-биологические эффекты наночастиц: реалии и прогнозы / В. П. Терещенко, Н. Т. Картель. – К.: Наукова думка, 2010. – 240 с.
12. Чекман І. С. Нанофармакологія / І. С. Чекман. – К., 2011. – 260 с.

13. Hoshno A. Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on their Surface Modification / A. Hoshno, K. Fujioka, T. Oku [et al.] // Nano Letters. – 2004. – Vol. 4, № 11. – P. 2163-2169.
14. Oberdorster G. Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects From Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy, Particle, Fibre Toxicology / G. Oberdorster, A. Maynard, K. Donaldson [et al.] // Nature Nanotechnology. – 2005. – Vol. 2, № 8. – P. 235-246.

УДК 611. 12-034:591. 33-092. 9

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕМБРІОТОКСИЧНОСТІ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ ТА НАНОЗОЛОТА Шаторна В. Ф.

Резюме. Серед сучасних досліджень з нанобіотехнологій зовсім незначна їх частина присвячена вивченню впливу тих чи інших нанопродуктів на ембріогенез та органогенез. Метою дослідження було моделювання тератогенного впливу ацетату свинцю на хід ембріогенезу, а також пошук нових біоантогоністів свинцю. Матеріалом експериментального дослідження було обрано щурів. В експериментальних моделях використовували розчини ацетату свинцю та цитрату золота, отриманого за аквананотехнологією. При ізолюваному введенні надмалих доз свинцю спостерігали виражені токсичні ефекти: зменшення кількості жовтих тіл вагітності, зменшення кількості та ваги ембріонів. При комбінованому введенні низьких доз свинцю та нанозолота спостерігається значне збільшення кількості жовтих тіл вагітності, кількості живих плодів, що свідчить про біоантагонізм свинцю та золота

Ключові слова: наноаквахелат золота, ацетат свинцю, ембріогенез, ембріотоксичність.

УДК 611. 12-034:591. 33-092. 9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧНОСТИ АЦЕТАТА СВИНЦА И НАНОЗОЛОТА

Шаторная В. Ф.

Резюме. Среди современных исследований по нанобиотехнологиям совсем незначительная их часть посвящена определению влияния тех или иных нанопродуктов на эмбриогенез и органогенез. Целью настоящего исследования было моделирование тератогенного влияния ацетата свинца на ход эмбриогенеза, а также поиск новых биоантогонистов ацетата свинца. Материалом экспериментального исследования было выбрано крыс. В экспериментальных моделях использовали растворы ацетата свинца и цитрата золота, полученного методом аквананотехнологии. При изолированном введении сверхмалых доз ацетата свинца наблюдали выраженные токсические проявления: уменьшение количества желтых тел. беременности, снижение количества и веса эмбрионов. При комбинированном введении низких доз свинца и наноаквахелата золота наблюдается значительное увеличение количества желтых тел беременности, количества живых плодов, что свидетельствует о биоантагонизме свинца и золота.

Ключевые слова: наноаквахелат золота, ацетат свинца, эмбриогенез, эмбриотоксичность.

UDC 611. 12-034:591. 33-092. 9

Experimental Research of Embryotoxicity of Lead Acetate and Nanogold Shatornaya V. F.

Summary. The current state of environmental problems of the industrial regions of Ukraine makes it relevant and timely study of the effect of trace elements and their nanoforms on overall health, reproduction and embryology. Information about the safety and potential risks of nanomaterials is urgently needed, both for the health of the adult and the developing organism. Unfortunately, studies on the impact of nanomaterials on the body are hardly touched identify the possible embryotoxic teratogenic effects production of Nano.

The aim of the study was to determine the effect of lead acetate in isolation or in combination with gold nanoaquaahelats on reproductive system and the process of embryogenesis experimental animals (rats). Pre-implantation mortality was determined by the difference between the number of corpora lutea in the ovaries of pregnant females and the number of implantation sites in the uterus. Postimplant mortality was calculated by the difference between the number of implantation sites and the number of viable fetuses. Studied embryotoxicity lead in the introduction of a stand-alone and in combination with nanogold: fertility index was calculated, the mass of embryos, number of embryos at one female in the group.

In experimental models used sodium citrate gold obtained aquananotechnology and a solution of lead acetate. The experimental work was carried out on Wistar rats mature white line (female) weighing 180-200 g rats Age 95 – 110 days. All rats were divided into three groups: the first group – animals lead acetate solution was added at 0.05 mg / kg, the second group – animals lead acetate solution was added at 0. 05 mg / kg and nanogold solution in a dose of 1, 5 mg / kg, group 3 – control. In accordance with generally accepted guidelines for experimental studies,

solutions of metals and nanometal administered by gavage once a day, at the same time from 1 to 19 days of gestation (the 20 th day of pregnancy was performed fence operative embryos).

The separate introduction of ultra-low doses of lead acetate observed pronounced toxic effects: reducing the number of corpora lutea of pregnancy, reducing the number and weight of embryos. We observed a significant decrease ($p < 0.05$) the number of live embryos at $17\% - 7,5 \pm 0,53$ $9,0 \pm 0,4$ vs control group. Observed an increase in total fetal mortality in 2. 16 times, more than pre-implantation. In this experimental group was observed not only the reduction of the embryos, but also reduced weight of embryos. Observed a decrease in the index of fertility. Under the combined effects of lead acetate + nanogold received positive results. 1. Increasing the number of live fetuses – 53. 3% in comparison with a group of lead poisoning. 2. An increase of 30. 4% of the number of corpora lutea in the ovaries of pregnant rats (compared with a group of intoxication). 3. The reduction in 2. 3 times of the level of overall mortality. This is the result of a reduction in pre-implantation mortality 2. 1 times and the lack of postimplant mortality. 4. Embryos weight in the group receiving a combination of lead and nanogold higher than in the group with insulated lead intoxication, but the difference is not reliable. 5. Index fertility of experimental animals in this group is reduced to the level of the control group.

The experimental results showed that co-administration of low doses of lead and nanogold led to an increase in the number of corpora lutea of pregnancy, increasing the number of live fetuses, due to a decrease preimplantation embryonic mortality compared with the group with lead intoxication. The weight of live embryos was not significantly altered. The experimental results give reason to believe that the introduction of gold nanoaquahelats against lead poisoning prevents the negative effects of the latter on the processes of embryonic development of the fetus and shows them bioantagonism.

Key words: nanoaquahelat of gold, lead acetate, embryogenesis, embryotoxicity.

Рецензент – проф. Олійник С. А.

Стаття надійшла 14. 05. 2013 р.