12. Brem F, Hirt AM, Winklhofer M, Frei K, Yonekawa Y, Wieser HG, Dobson J. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumour and hippocampal tissue. J. R. Soc. Interface. 2006;3:833–41.

13. Chekhun VF, Gorobets SV, Gorobets OYu, Demyanenko IV. [Magnetic nanostructures in tumour cells]. Research bulletin of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2011;9:12-21. Ukrainian.

14. Mellaert L, Barbe S, Anne J. Clostridium spores as anti-tumour Agents. TRENDS in Microbiology. 2006;14:190-6.

15. Vainshtein M, Suzina N, Kudryashova E, Ariskina E. New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells. Biology of the Cell. 2002;94:29–35.

16. Richard BF. Biologically Induced Mineralization by Bacteria. Reviews in Mineralogy and Geochemistry. 2013;54:95-114.

Стаття надійшла до редакції
17.10.2013

УДК 546.59:543.272.82]:661.8…745:612.014.46:591.33-092.9

В.Ф. Шаторна,
В.І. Гарець,
Е.М. Білецька*,
Н.М. Онул*,
О.О. Нефьодова,
С.С. Островська,
С.В. Степанов,
Н.І. Діхно

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МОДИФІКУЮЧОГО ВПЛИВУ НАНОАКВАХЕЛАТУ ЦИТРАТУ ЗОЛОТА НА ЕМБРІОТОКСИЧНІСТЬ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ У ЩУРІВ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
кафедра медичної біології, фармакогнозії та ботаніки
(зав. – д. мед. н., проф. В.І. Гарець)
вул. Севастопольська, 19, Дніпропетровськ, 49027, Україна
*кафедра загальної гігієни**
(зав. – д. мед. н., проф. Е.М. Білецька)
пл. Жовтнева, 4, Дніпропетровськ, 49027 Україна
SE "Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine"
Department of Medical Biology, Botany and Pharmacognosy
Sevastopolskaja str., 19, Dnipropetrovsk, 49005, Ukraine
e-mail: verashatornaya@yandex.ru
*Department of General Hygiene**
Oktyabrskaya sq., 4, Dnipropetrovsk, 49027, Ukraine
e-mail: verashatornaya@yandex.ru

Ключові слова: *нанометали, цитрат золота, ацетат свинцю, эмбріогенез*
Key words: *nanometals, gold citrate, lead acetate, embryogenesis*

Реферат. Экспериментальное исследование модифицирующего влияния наноаквахелата цитрата золота на эмбриотоксичность ацетата свинца у крыс. Шаторная В.Ф., Гарец В.И., Белецкая Э.Н.*, Онул Н.М.*, Нефедова О.О., Островская С.С., Степанов С.В., Дихно Н.И. *Среди современных исследований в области нанобиотехнологий лишь незначительная их часть посвящена исследованию влияния нанометаллов на органы репродуктивной системы и эмбриогенез. При этом если функции отдельных металлов-микроэлементов изучены достаточно хорошо, то физиологическая роль такого ультрамикроэлемента, как золото, все еще*

остается малоизученной, особенно в области его взаимодействия с другими металлами. В статье представлены результаты изучения комбинированного действия ацетата свинца и цитрата золота, полученного с использованием нанотехнологий, на эмбриональное развитие лабораторных крыс. Металлы вводили перорально ежедневно в течении 19 дней беременности в дозе 0,05 мг/кг по свинцу и 1,5 мкг/кг по золоту. Влияние исследуемых веществ оценивали по интегральным и специфическим показателям с использованием физиологических, морфологических и количественных методов анализа. Установлено, что ацетат свинца в дозе 0,05 мг/кг обладает эмбриотоксическим действием, что проявляется в увеличении эмбриолетальности и снижении числа особей в помете. Комбинированное введение цитрата золота и ацетата свинца ослабляет эмбриотоксическое действие последнего, что проявляется в увеличении количества желтых тел беременности на 30,4%, увеличении числа живых эмбрионов на 53,3% и снижении общей эмбриональной смертности в 2,3 раза.

Abstract. Experimental study of modifying influence of nanoaquachelate gold citrate on embryotoxicity of lead acetate in rats. Shatorna V.F., Garetz V.I., Biletska E.M.*, Onul N.M.*, Nefyodova O.O., Ostrovska S.S., Stepanov S.V., Dihno N.I. *Among modern investigations in nanobiotechnology, only a small part of them is devoted to the influence of nanometals on reproductive organs and embryogenesis. Thus, if functions of the separate trace metals are studied well enough, the physiological role of such ultramicroelements as gold is still poorly studied especially in the field of its interaction with other metals. The aim of the research was an experimental study of peculiarities of gold aquananocitrate and lead acetate interaction and their impact on rats' embryogenesis under condition of combined administration. There were used solutions of lead acetate and citrate gold in experimental models obtained by aquananotehnology. Solutions of metals and nanometals were injected perorally once a day during 19 days of pregnancy: solution of lead acetate in the dose of 0.05 mg/kg and gold aquananocitrate solution in the dose of 1.5 mg/kg. 3 group - control group. Influence of tested substances was assessed by integral and specific indicators using physiological, morphological and quantitative analysis methods. It was established that lead acetate in the dose of 0.05 mg/kg is characterized by severe embryotoxic effect manifested by total embryonic mortality, and reducing number of live fetuses in the offspring. Combined introduction of gold aquananocitrate and lead acetate weakens embryotoxic effect of lead, manifested by increase of corpora lutea number by 30.4%, increase of offspring number by 53.3% and decrease of fetal mortality by 2.3 times.*

Як свідчать дослідження останніх років, у XXI столітті прогрес нанонауки значно впливає на розвиток техніки, фізики, хімії, біології, сільського господарства, медицини, фармакології, ветеринарії, а також на економічне й соціальне сьогодення. Застосування нанорозмірних речовин для діагностики, профілактики й лікування різних захворювань вже має не тільки медичне, але й соціально-гуманітарне значення, з урахуванням біоетичних аспектів вивчення механізму їх дії, із застосуванням нових токсикологічних принципів, методів і показників [3, 4].

У площині вищезазначеного проблема забезпечення живих організмів мікроелементами, вивчення їх впливу на процеси росту, розмноження та нормального функціонування органів та систем організму є важливою складовою сучасної медичної науки [8, 11]. Відомо, що окремі метали, зокрема цинк, мідь, хром є есенціальними, вони виконують низку життєво необхідних функцій в організмі у складі металоферментів [1, 7]. У той же час фізіологічна роль таких ультрамікроелементів, як золото та срібло, незважаючи на підвищений інтерес наукової спільноти до них, залишається маловивченою. Здатність золота регулювати експресію протизапальних генів, зв'язувати пероксидні радикали, пригнічувати розвиток злоякісних клітин [3] викликає інтерес сучасних дослідників. Механізм дії сполук золота до кінця не ясний, проте на цей час відомо, що золото може входити до складу металопротеїнів, взаємодіяти з міддю, може залучатися до процесів зв'язування гормонів у тканинах. Токсичні ефекти золота зазвичай пов'язані з передозуванням або побічними ефектами при застосуванні його солей у терапії ревматоїдних артритів. Останнім часом в медицині для діагностики та лікування захворювань все частіше використовують наноформи золота [4]. При цьому серед учених не вщухають суперечки з приводу їх можливої токсичності і здатності викликати мутації.

Серед сучасних досліджень у сфері нанобіотехнологій зовсім незначна їх частина присвячена вивченню впливу тих чи інших нанометалів на органи репродуктивної системи та ембріогенез [1, 2, 5], більшість досліджень присвячена вивченню біологічних ефектів нанометалів на клітинному рівні [10, 12, 13]. Відомості стосовно ефектів впливу наночастинок золота на ембріон взагалі досить обмежені та суперечливі. У той же час важливою складовою розуміння есенціальної чи токсичної ролі золота є вивчення його антагоністичних та/або синергічних взаємозв'язків з ксенобіотиками, зокрема свинцем, що особливо актуально для промислових областей України [2,

5, 7, 11]. За таких умов дослідження комбінованого впливу золота та свинцю на ембріогенез, визначення особливостей їх взаємодії є важливим аспектом сучасної медицини.

Метою дослідження є експериментальні дослідження особливостей взаємодії аквананоцитрату золота та ацетату свинцю, їх впливу на ембріогенез щурів за умови комбінованого введення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В експериментальних дослідженнях використовували самиць щурів лінії Wistar. Вибір об'єктом дослідження саме цих лабораторних тварин зумовлений низьким рівнем у них спонтанних вад розвитку порівняно з мишами та кролями. Дослідження на тваринах проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001), які узгоджуються з Європейською конвенцією про захист експериментальних тварин (Страсбург, 1985).

Перед початком експерименту всі тварини були оглянуті, зважені, враховувався їхній вік, рухова активність та стан шкіри. Під час спостереження лабораторні тварини утримувались у звичайних умовах віварію ДЗ «ДМА».

В експериментальних моделях використовували розчини ацетату свинцю та цитрату золота, отриманого за аквананотехнологією [6]. Цитрати біометалів безпечні, більше того, вони проявляють антиоксидантну і радіопротекторну дію, позитивно впливають на серцево-судинну й імунну системи організму [5]. Цитрат золота отримано за новітньою авторською технологією в науково-дослідному інституті Нанобіотехнологій та ресурсозбереження України (патент України № 49050. Спосіб Каплуненка- Косінова отримання карбоксилатів з використанням нанотехнології). Моделювання впливу розчинів нанометалів на організм самиці та на ембріогенез у щурів проводили шляхом введення розчинів металів та нанометалів у шлунок через зонд одноразово, в один і той же час, з 1 по 19 день вагітності. Було сформовано 3 групи тварин (всього 24 тварини): 1 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05мг/кг; 2 група – тварини, яким вводили комбінацію ацетату свинцю у дозі 0,05 мг/кг та розчин нанозолота у дозі 1,5 мкг/кг; 3 група - контрольна. Чутливість зародка до токсичної дії речовин залежить від стадії розвитку і строки введення речовини вагітним самкам повинні охоплювати весь період вагітності.

Дослідних тварин виводили з експерименту способом передозування ефірного наркозу після вилучення матки з ембріонами. Щурят вилучали з матки, перевіряли на тест живі-загиблі, зважували, вимірювали, визначали стать, фотографували та фіксували у 10% розчині формаліну для подальшого гістологічного дослідження. У роботі застосований комплексний підхід з використанням фізіологічних і морфологічних методів дослідження: Фізіологічні методи - контроль приросту маси тіла, визначення строків настання статевого дозрівання самиць, спостереження за статевим циклом (вагінальні мазки на визначення стадії еструсу, кількість жовтих тіл в яєчниках) і статевою поведінкою. Морфологічні методи: макроскопічні (макроскопічний опис органів, органометричні методи) - для вивчення можливих змін на органному рівні та наступні мікроскопічні дослідження. Показниками ембріотоксичності служать: перед- і постімплантаційна ембріональна смертність, морфологічні (анатомічні) вади розвитку та загальна затримка розвитку плодів. Вплив на хід ембріогенезу досліджуваних речовин оцінювали за такими показниками:

1. Загальна ембріональна смертність (ЗСЕ)

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

де А – кількість живих плодів;
В – кількість жовтих тіл вагітності.

2. Передімплантаційна смертність (ПІС)

$$ПІС = \frac{В-(А+Б)}{В} (од.), \quad (2)$$

де А – кількість живих плодів;
Б – кількість загиблих (резорбованих) плодів;
В – кількість жовтих тіл вагітності.

3. Постімплантаційна смертність (ПостІС)

$$ПостІС - \frac{Б}{А+Б} (од.), \quad (3)$$

де А – кількість живих плодів;
Б – кількість загиблих (резорбованих) плодів.

4. Кількість плодів на 1 самку

Всі отримані в роботі цифрові дані обробляли комп'ютерними ліцензійними програмами Microsoft Excel, Statistica 10. Достовірність відмінностей визначали за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Порівняння отриманих результатів у групі впливу ацетату свинцю з показниками контрольної групи виявило пригнічення ембріонального розвитку експериментальних тварин. Відомо, що провідним показником ембріотоксичності будь-якої сполуки є середня кількість ембріонів на 1

самицю, яка в групі, що зазнавала впливу ацетату свинцю, знаходилась на рівні 7,5±0,53, у той час як у контрольній групі цей показник, за середніми значеннями, становив 9,0±0,4. Таким чином, отримані результати свідчать про достовірне зниження кількості живих плодів у посліді на 17% при впливі ацетату свинцю (рис. 1).

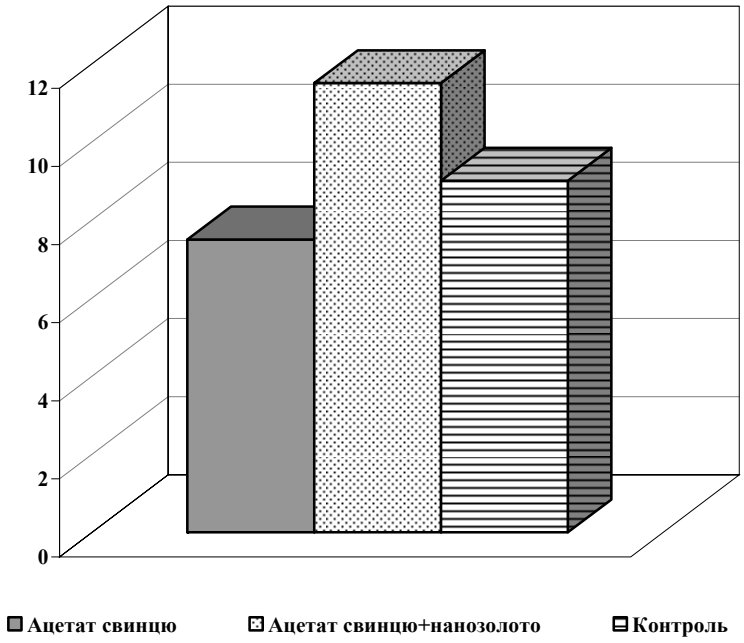

Рис. 1. Кількість живих ембріонів (на 1 самицю) в експериментальних та контрольній групах

У групі, що отримувала комбінацію ацетату свинцю та цитрату золота, крім того, спостерігається покращення показників ембріонального розвитку не лише порівняно з групою, що отримувала ацетат свинцю ізольовано, але і з показниками контрольної групи. Так, у групі, що отримувала комбінацію цитрат золота-ацетат свинцю, кількість живих плодів на 1 самицю становила 11,5±0,93, що на 53,3% вище *(p<0,001)* порівняно з групою, що отримувала ацетат свинцю ізольовано, та на 27,8% вище *(p<0,05)* - порівняно з контрольною групою. Така ситуація, ймовірно, пов'язана не лише зі зниженням проявів ембріотоксичності свинцю при комбінованому його введенні з цитратом золота, але і з певною стимулюючою дією останнього на ембріональний розвиток експериментальних тварин.

Збільшення чисельності плодів у посліді самиць, що зазнали комбінованого впливу досліджуваних сполук, порівняно з ізольованим надходженням свинцю, зумовлене змінами показників ембріолетальності та кількості жовтих тіл вагітності. Так, у групі, що отримувала ацетат свинцю, рівень загальної ембріональної смертності становив 24,05±1,33%, що у 2,1 разу достовірно вище, ніж у групі контролю – 11,11±4,43%. Одночасне введення аквананоцитрату золота та ацетату свинцю призвело до достовірного зниження ембріолетальності у 2,7 разу порівняно із групою, що отримувала ацетат свинцю ізольовано. При цьому виявлено певні відмінності у рівнях до- та постімплантаційної смертності у дослідних групах. Так, встановлено, що доімплантаційна смертність у групі, що зазнавала ізольованого впливу ацетату свинцю, достовірно зросла у 2,3 разу порівняно з показниками контрольної групи і становила 0,23±0,06 од. У той же час у групі, що отримувала комбінацію досліджуваних металів, рівень доімплантаційної смертності практично відповідав показникам інтактних тварин – 0,11±0,10 од. Постімплантаційна смертність у групі впливу ацетату свинцю була дещо вищою, а в групі комбінованого впливу зовсім відсутня порівняно з контрольною групою. Вищенаведене дає можливість припустити, що регуляція чисельності приплоду в умовах тривалого впливу токсичних агентів під час вагітності відбувається переважно в доімплантаційний період (рис. 2) і забезпечує кращі умови розвитку потомства.

Кількість жовтих тіл вагітності в яєчниках самиць при введенні ацетату свинцю суттєво не

відрізнялась від показників контрольної групи - 9,88±0,53 та 10,13±0,53 відповідно. У той же час комбіноване введення аквананоцитрату золота та ацетату свинцю призвело до достовірного збільшення кількості жовтих тіл вагітності на 30,4% ($p<0,05$), що може бути свідченням протекторної дії наносполук золота по відношенню до ембріотоксичності свинцю.

Таким чином, у результаті проведених експериментальних досліджень встановлено, що комбіноване введення аквананоцитрату золота та ацетату свинцю попереджує ембріотоксичність останнього, що проявляється зниженням ембріолетальності, збільшенням кількості жовтих тіл вагітності, покращенням ембріонального розвитку.

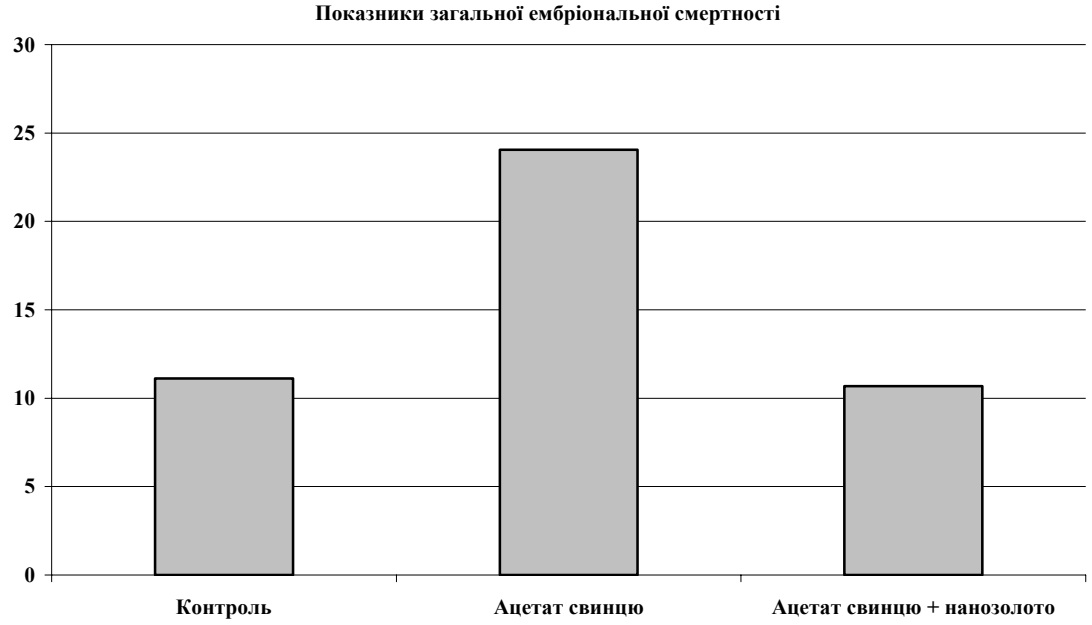

Рис. 2. Показники загальної ембріональної смертності в контрольній та експериментальних групах

ВИСНОВКИ

1. Ацетат свинцю в дозі 0,05 мг/кг характеризується вираженою ембріотоксичною дією за показниками загальної ембріональної смертності, особливо в передімплантаційний період, та зниженні кількості живих плодів у посліді.
2. Введення цитрату золота в аквананохелатній формі ослаблює ембріотоксичний вплив свинцю, що проявляється підвищенням кількості жовтих тіл вагітності на 30,4%, збільшенням чисельності приплоду на 53,3% та зниженням ембріолетальності у 2,3 разу при комбінованому введенні досліджуваних сполук порівняно з ізольованим впливом ацетату свинцю.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Біопротекторна дія цинку в макро- і наноаквахелатній формі на ембріогенез щурів за умови свинцевої інтоксикації / Е.М. Білецька, І.С. Чекман, Н.М. Онул [та ін.] // Медичні перспективи. – 2013. – №2. – С. 114-119.
2. Дослідження впливу нанометалів на стан репродуктивної функції в ембріогенезі / В.Ф. Шаторна, В.І. Гарець, О.О. Савенкова, І.І. Колосова // Таврич. мед.- биол. вестник. – 2013. – Т. 16, № 1 (61), ч.1 – С. 246-251.
3. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії / за ред. проф. В.Б. Борисевича, проф. В.Г. Каплуненко. – К.: ВД «Авіцена», 2010. – 416 с.
4. Нанонаука і нанотехнології: технічний, медичний та соціальний аспекти / Б.П. Патон, В.Ф. Москаленко, І.С. Чекман, Б.О. Мовчан // Вісник НАН України. – 2009. – № 6. – С. 18–26.
5. Нанотехнології мікронутрієнтів: проблеми, перспективи та шляхи ліквідації дефіциту макро- та мікроелементів / А.М Сердюк, М.П. Гуліч, В.Г. Каплуненко, М.В. Косінов // Журнал АМН України. – 2010. – Т. 16, № 3. – С. 467-471.
6. Новинюк Л.В. Цитраты – безопасные нутриенты / Л.В. Новинюк // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 2009. – №3 – С. 70-71.

7. Онул Н.М. Експериментальна оцінка ембріотоксичності свинцю як фактору малої інтенсивності / Н.М.Онул // Таврич. мед.-биол. вестник. – 2013. - Т. 16, № 1 (61), ч.1. – С. 165-168.

8. Скальный А.В. Биоэлементы и показатели эмбриональной смертности лабораторних крыс / А.В. Скальный, С.В. Залавина, С.В. Ефимов // Вестник ОГУ. – 2006. - №2. – С. 78-81.

9. 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.

10. Терещенко В.П. Медико-биологические эффекты наночастиц: реалии и прогнозы / В.П. Терещенко, Н.Т. Картель. – К.: Наукова думка, 2010. – 240 с.

11. Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на репродуктивную функцию женщин / А.М. Сердюк, Э.Н. Белицкая, Н.М. Паранько, Г.Г. Шматков. – Днепропетровск: АРТ-ПРЕСС, 2004. – 148 с.

12. 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, N 11. – P. 2163-2169.

13. Principles for Characterizing the Potential Human Helth 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, N 8. – P. – 235-246.

REFERENCES

1. Bilets'ka EM, Chekman IS, Onul NM. [Bioprotective effect of zinc in macro-and nanoaquahelat form in rats embryogenesis under lead intoxication]. Medichni perspektivi. 2013;2:114-9. Ukrainian.

2. Shatorna VF, Garets' VI, Savenkova OO, Kolosova II. [Research of nanometal impact on reproductive function in embryogenesis]. Tavricheskiy mediko-biologicheskiy vestnik. 2013;16(1)part 1(61):246-51. Ukrainian.

3. Borisevicha VB, Kaplunenko VG. [Nanomaterials in biology. Bases of nano-veterinary]. K.: VD «Avitsena». 2010;416. Ukrainian.

4. Paton BP, Moskalenko VF, Chekman IS, Movchan BO. [Nanoscience and nanotechnologies : technical, medical and social aspects]. Visnik natsional'noї akademiї nauk Ukraïni. 2009;6:18–26. Ukrainian.

5. Serdyuk AM, Gulich MP, Kaplunenko VG, Kosinov MV. [Nanotechnology micronutrients: problems, perspectives and ways to eliminate the deficit of macro- and microelements]. Zhurnal Akademiї medichnikh nauk Ukraïni. 2010;16(3):467-71. Ukrainian.

6. Hovinyuk LV. [Citrates - Safe Nutrients]. Pishchevye ingredienty. Syr'e i dobavki. 2009;3:70-71. Russian.

7. Onul NM. [Experimental estimation of embriotoxity of lead as a factor of small intensity]. Tavricheskiy mediko-biologicheskiy vestnik. 2013;16(1)part 1(61):165-8. Ukrainian.

8. Skal'nyy AV, Zalavina SV, Efimov SV. [Bioelements and indicators of embryonic mortality of laboratory rats]. Vestnik OGU. 2006;2:78-81. Russian.

9. Rodimin VE, Gegenava AV, Derzhavina NA, Gasanova ZM. [Methods for introduction of gold nanoparticles in the biological tissue]. Vestnik otorinolaringologii. 2006;1:27-31. Russian.

10. Tereshchenko VP, Kartel' NT. [Medico-biological effects of nanoparticles: realities and forecasts]. K.: Naukova dumka. 2010;240. Russian.

11. Serdyuk AM, Belitskaya EN, Paran'ko NM, Shmatkov GG. [Heavy metals in the external environment and their impact on the reproductive function of women]. Dnepropetrovsk: ART-PRESS. 2004;148. Russian.

12. Hoshno A, Fujioka K, Oku T. Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on their Surface Modification. Nano Letters. 2004;4(11):2163-9.

13. Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K. Principles for Characterizing the Potential Human Helth Effects From Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy, Particle, Fibre Toxicology. Nature Nanotechnology. 2005;2(8):235-46.

Стаття надійшла до редакції
25.04.2014