

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ЛАБИРИНТНОЙ ЗОНЫ ПЛАЦЕНТЫ БЕЛЫХ КРЫС НА ПАРЕНТЕРАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА РАЗНОЙ ВЕЛИЧИНЫМИХЕЕВА Н.А.¹, Хайруллин Р.М.², ТЕРЕНТЮК Г.С.², МИХЕЕВ В.А.³**MORPHOLOGICAL REACTION OF THE LABYRINTH ZONE OF THE WHITE RATS PLACENTA AT THE PARENTERAL INJECTION OF GOLD NANOPARTICLES OF DIFFERENT SIZES**

MIKHEEVA N.A., KHAYRULLIN R.M., TERYTYUK G.S., MIKHEEV V.A.

¹Кафедра биологии, экологии и природопользования (зав. кафедрой – доцент С.М. Слесарев) экологического факультета и ²кафедра анатомии человека (зав. кафедрой – профессор Р.М. Хайруллин) медицинского факультета ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет» Минобрнауки РФ; ³кафедра биологии и химии (зав. кафедрой – доцент О.Е. Беззубенкова) естественно-географического факультета ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова» Минобрнауки РФ; г. Ульяновск.

Наноразмерные материалы всё более широко используются для решения фундаментальных проблем и в прикладных биомедицинских исследованиях. Наиболее хорошо изучены токсичность, биораспределение и биофизические свойства наночастиц золота. Они занимают особое место среди наноразмерных материалов, используемых для диагностических и терапевтических целей, активно исследуются как наноразмерные инструменты для оптической или магнитной визуализации клеток и тканей, как носители лекарственных препаратов для животных и человека и как диагностические препараты нового поколения. При разработке новых лекарственных препаратов, исследования проницаемости плацентарного барьера для них, как правило, ограничиваются параметрами общей и селективной токсичности, изучением клеточных реакций матери и плода, ближайшей и отдалённой тератогенностью. Нанотехнологии могут предложить для решения этой проблемы более информативные методы, ассоциированные с лекарственными конъюгатами препараты нанофармацевтики могут помочь в исследованиях механизмов проницаемости не только плацентарного, но и других гематотканевых барьеров. Исследованию механизмов проницаемости плацентарного барьера должно

предшествовать изучение тканевых и клеточных реакций плаценты на введение нанотехнологических препаратов. Целью настоящего исследования является изучение морфологических реакций лабиринтной зоны плаценты белых крыс на парентеральное введение наночастиц золота разной величины. Наночастицы золота размером 5, 10, 30, 50 и 150 нм, покрытые полиэтиленгликолем, вводили внутривенно беременным самкам белых крыс на 15 день гестации в дозе 0,8 мг/кг животного. Наночастицы золота в тканях плаценты визуализировали методом аутометаллографии нитратом серебра, общее содержание золота в тканях плодов оценивали методом атомной абсорбционной спектроскопии. С помощью этого метода установлена проницаемость гемохориального барьера крысиной плаценты для наночастиц золота величиной 5, 10, 30 и 50 нм *in vivo*. Морфологический анализ гистологических препаратов плаценты на светооптическом уровне свидетельствует о формировании неспецифических адаптационных реакций структур лабиринтной зоны плаценты, расширения кровеносных сосудов и капилляров, полнокровия, эритроцитарного стаза, расширения материнских лакун. Полученные данные свидетельствуют о необходимости учёта морфологических реакций лабиринтной зоны плаценты на парентеральное введение наночастиц золота и их размерной проницаемости для оценки перспективности использования синтезируемых лекарственных препаратов с наноносителями в ветеринарной и медицинской фармацевтике.

Ключевые слова: наночастицы золота, гематолацентарный барьер, нанодиагностика, нанофармацевтика.

Nanoscale materials are increasingly used to solve the fundamental problems and in applied biomedical research. The most well studied toxicity, biodistribution and biophysical properties of gold

nanoparticles. They occupy a special place among the nanoscale materials used for diagnostic and therapeutic purposes, actively investigated as a nano-sized tools for optical or magnetic imaging of cells and tissues, as carriers how of medicinal products for human and animal diagnostic preparations of the new generation. In the making of new drugs, the study of placental permeability barrier for them, as a rule, limited to the parameters of the general and selective toxicity study cellular responses mother and fetus, the nearest and distant teratogenicity. Nanotechnology can offer to solve the problem with more informative methods associated with drug conjugates. Nanopharmaceutics drugs can help in studies of mechanisms not only of placental permeability, but also of other blood-tissue barriers. Investigation of the mechanism of placental permeability barrier must be preceded by study of tissue and cellular responses of the placenta to the injection of nanotechnological therapeutic drugs. The purpose of this study is to investigate the morphological responses labyrinthine zone placenta white rat on parenteral administration of gold nanoparticles of different diameters. Gold nanoparticles with a diameter of 5, 10, 30, 50 and 150 nm, coated with polyethylene glycol was injected intravenously to pregnant female white rats at day 15 of gestation in the dose of 0.8 mg/kg of each animal. Gold nanoparticles in placental tissues were visualized by silver nitrate autometallography and total content of gold in the fetal tissues evaluated by atomic adsorption spectroscopy. With this method was studied the permeability of the rat's placental barrier for gold nanoparticles with diameters of 5, 10, 30 and 50 nm in vivo. Morphological analysis of histological preparations of the placenta on the light optic level indicates the formation of non-specific adaptation reactions structures labyrinthine zone of the placenta, the expansion of blood vessels and capillaries, plethora, erythrocyte stasis, increasing of number of maternal blood lacunae. These findings suggest the need to consider the morphological responses of the labyrinthine zone placenta of white rats on parenteral injection of gold nanoparticles and their dimensional permeability to assess for the prospects of using new synthesized drugs with nanocarriers in veterinary and medical pharmaceutics.

Key words: *gold nanoparticles, the blood-placenta barrier, nanodiagnostics, nanopharmaceutics.*

Введение. Пренатальный период развития животных и человека характеризуется большей чувствительностью к токсическим воздействиям, чем зрелый возраст. Многочисленными исследованиями показано, что ряд ксенобиотиков воздуха, пищи, воды могут вызывать осложнения при протекании беременности, а также оказывать

эмбриотоксическое воздействие [1]. Потенциальное токсическое и морфогенетическое влияние веществ на развивающийся организм в первую очередь определяется состоянием плацентарного транспорта и проницаемости гемато-плацентарного барьера. В последние годы все более широкое применение в фундаментальных и прикладных биомедицинских исследованиях получают наноразмерные материалы [2]. Особое место среди наноразмерных материалов, применяемых для диагностических и терапевтических целей, занимают наночастицы золота, которые широко используются для оптической или магнитной визуализации структур клеток и тканей, как наночастицы лекарственных и диагностических препаратов в ветеринарной и медицинской практике [3]. Исследование проницаемости плацентарного барьера в биомедицине ограничено некоторыми общепринятыми способами, в то время как нанотехнологии могут существенно расширить их спектр. Для решения этой проблемы можно использовать методы инъекций наночастиц, ассоциированных с лекарственными конъюгатами, которые способны избирательно (таргетно) накапливаться в тканях плаценты и развивающегося плода [4]. Однако применению нанотехнологических подходов во время беременности должно предшествовать изучение проницаемости самих наночастиц золота через гематоплацентарный барьер и возможных морфологических реакций плаценты, её модулирующих.

Цель исследования - изучить морфологических реакции лабиринтной зоны плаценты белых крыс на парентеральное введение наночастиц золота и уровня их накоплений в тканях плода.

Материал и методы исследования. Эксперимент был проведен на самках белых беспородных лабораторных крыс, которым на 15-е сутки беременности в хвостовую вену вводили 0,7 мл суспензии пэгелированных наночастиц золота (в концентрации 80 мкг/кг животного) со средним размером 5, 10, 30, 50 и 150 нм. Использованные в исследовании золотые наночастицы были синтезированы в лаборатории биосенсоров и наноразмерных структур ИБФРМ РАН (г. Саратов, зав. лабораторией – д.ф.-м.н., проф. Н.Г. Хлебцов). Выбор крыс в качестве подопытных животных определялся сходным с человеческим типом плаценты (гемохориальный тип), а также типичным для млекопитающих строением органов половой системы [5]. Гемохориальная плацента белых крыс состоит из зоны гигантских клеток трофобласта, промежуточной зоны и лабиринта, которые представляют собой собственно гемато-плацентарный барьер и участвуют в трансплацентарном обмене между материнской и фетальной кровью. Контрольной группе животных на 15-е

Таблица 1.

Содержание золота (мкг/г) в плодах после парентерального введения беременным крысам препаратов наночастиц золота разной величины

Наименование группы животных	Содержание золота в нг/г веса плода
Интактная группа	0,12±0,03
Плоды животных контрольной группы	0,11±0,07
Плоды животных, подвергшихся введению препарата наночастиц золота размером 5 нм	3,2±0,4*
Плоды животных, подвергшихся введению препарата наночастиц золота размером 10 нм	3,6±0,5*
Плоды животных, подвергшихся введению препарата наночастиц золота размером 30 нм	2,75±0,9*
Плоды животных, подвергшихся введению препарата наночастиц золота размером 50 нм	6,58±1,9*
Плоды животных, подвергшихся введению препарата наночастиц золота размером 150 нм	0,09±0,03

Примечание: * - статистически значимые по критерию t отличия показателей от животных контрольной группы ($p < 0,05$).

сутки беременности вводили физиологический раствор аналогичного объема. Кроме того, была использована интактная группа животных. Каждая группа была представлена не менее 6 животными. Через сутки после введения наночастиц золота или физиологического раствора животных выводили из эксперимента под хлороформным наркозом. Все эксперименты, уход и содержание осуществлялись в соответствии с Директивой № 63 от 22 сентября 2010 года Президиума и Парламента Европы «О защите животных используемых для научных исследований», «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник от 06.04.1993 и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». На исследования было получено разрешение локального этического комитета ФГБОУ ВПО «Ульяновский госуниверситет» Минобрнауки РФ. Препараты плаценты животных фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5-6 мкм. Для морфологического анализа проводили окраску гематоксилином и эозином по стандартной методике. Для морфометрического исследования применяли компьютерную видеотестсистему, включающую микроскоп «Motic», цифровую видеокамеру «JVC» («VICTOR COMPANY OF JAPAN», Япония) и компьютерную программу денситофотометрии «МЕКОС-Ц1» («Медицинские Компьютерные Системы (МЕКОС)», Россия). Морфометрия включала измерение массы плаценты, относительных площадей материнских лакун лабиринтной зоны, стромы балок и площади фе-

тальных сосудов. В процессе морфометрических исследований руководствовались рекомендациями Г.Г. Автандилова [6]. Для оценки проницаемости гематоплацентарного барьера для золотых наночастиц использовали метод атомной абсорбционной спектроскопии (Dual Atomizer Zeeman AA spectrometer iCE 3500, Thermo Scientific Inc., USA), позволивший определить концентрацию золота в тканях плодов при использовании их целостных препаратов. Для визуализации накопления наночастиц золота в клеточных и тканевых структурах плаценты и тканях плодов применяли метод автоматаллографии нитратом серебра на парафиновых гистологических срезах в собственной модификации [7].

Результаты исследования и их обсуждение. В настоящем исследовании установлена проницаемость наночастиц золота размером 5, 10, 30 и 50 нм через гемато-плацентарный барьер лабораторных белых крыс *in vivo*. С помощью метода атомной абсорбционной спектроскопии установлено, что в целостных препаратах плодов экспериментальных групп тотальное содержание наночастиц золота статистически значимо превышает таковое плодов от животных контрольной группы в среднем в 8 раз (см. табл. 1, статистическая значимость различий на уровне $p < 0,005$). Содержание золота в препаратах плодов интактных животных - 0,12±0,03 нг/г и животных контрольной группы, которым вводили физиологический раствор - 0,11±0,07 нг/г, было практически идентично. Наибольшее содержание установлено в препаратах плодов животных, подвергшихся введению препарата наночастиц

Таблица 2.

Морфометрические показатели лабиринтной зоны плаценты белых крыс при введении препаратов наночастиц золота разной величины

Группа	Показатель			
	Масса плаценты (г)	Относительная площадь материнских лакун в %	Относительная площадь стромы балок в %	Относительная площадь фетальных сосудов в %
Интактная	0,71±0,005	32,88±1,68	53,68±1,53	14,43±0,69
Контрольная	0,71±0,004	39,77±1,12*	45,53±2,20*	14,70±1,48
5 нм	0,69±0,004	46,63±2,14*	39,92±2,01*	13,46±0,62
10 нм	0,71±0,003	44,01±2,01*	41,12±2,11	14,87±1,19
30 нм	0,71±0,005	42,68±1,13*	42,01±0,47	15,32±1,31
50 нм	0,72±0,005	39,65±1,44*	44,20±1,77	16,15±0,95
150 нм	0,70±0,003	39,32±1,67*	45,03±1,38*	15,65±1,38

Примечание: * - статистически значимые различия показателя с показателем животных интактной группы ($p < 0,05$)

золота размером 50 нм - $6,58 \pm 1,9$ нг/г (табл. 1). Не обнаружено существенных различий для проницаемости через гемато-плацентарный барьер к плоду наночастиц золота размером от 5 до 30 нм. Согласно полученным результатам можно полагать, что наночастицы золота размером 150 нм практически не проникают через плацентарный барьер. В препаратах плодов от животных, которым вводили наночастицы размером 150 нм, содержание золота составило $0,09 \pm 0,03$ нг/г, что равно показателю группы интактных животных и животных контрольной группы. Однако эти результаты требуют гистохимического обоснования и количественного подтверждения циркуляции и большего содержания тканевого золота в тканях и органах беременных самок соответствующей группы.

Автометаллография гистологических препаратов органов и тканей плодов позволила выявить органы основного накопления наночастиц золота – наночастицы определялись в их печени и селезенке. Гистохимически было подтверждено, что гемато-плацентарный барьер животных с хориальным типом плаценты непроницаем для наночастиц золота размером 150 нм. Результаты автоматометаллографии не позволили выявить наночастицы золота в тканях плодов.

Масса плацент животных, подвергшихся введению суспензий наночастиц золота разной величины, не имеет статистически значимых различий по сравнению с аналогичными показателями животных как интактной, так и контрольной групп ($p > 0,05$, табл. 2). Плацента всех групп животных имеет типичное строение. Лабиринт представ-

лен трофобластическими балками, которые со стороны лакун омываются материнской кровью, внутри балок определяются фетальные сосуды. Вся лабиринтная зона плаценты животных всех экспериментальных групп полностью дифференцирована и соответствует гестационному сроку. Лабиринтные балки имеют трехслойное строение и представлены одним слоем трофобласта и двумя эпителиальными слоями. Балки всех групп животных хорошо васкуляризованы, бессосудистые балки обнаружены не были. Для животных контрольной группы характерны умеренно расширенные материнские сосуды, более полнокровные по сравнению с фетальными сосудами (рис. 1, «А»).

Нами установлено, что парентеральное введение раствора наночастиц золота беременным самкам белых лабораторных крыс обуславливает увеличение относительной площади материнских лакун по сравнению с аналогичным параметром плаценты животных интактной группы ($p \leq 0,05$). Вероятно, это вызвано введением дополнительного объема жидкости в кровотоки животных. На это косвенно указывает отсутствие статистически значимых различий в показателях относительной площади материнских лакун животных, которым вводили суспензии наночастиц золота, и животных, подвергшихся введению физиологического раствора в равном объеме (табл. 2). Относительная площадь фетальных сосудов для всех групп животных не различалась.

Кроме того, для материнских лакун лабиринтной зоны плаценты животных, подвергшихся введению наночастиц золота и физиологического раствора, характерны полнокровие, эритроцитар-

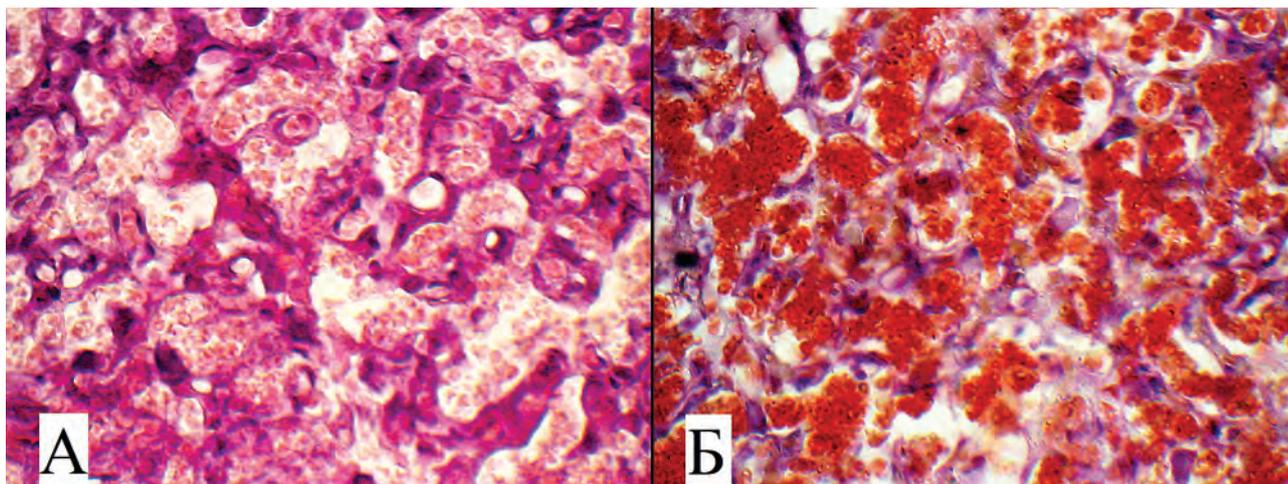


Рис. 1. Микрофото лабиринтной зоны плаценты белой крысы на 15-е сутки беременности: А – животного контрольной группы, Б – животного после внутривенного введения раствора наночастиц золота диаметром 5 нм. Окраска гематоксилином и эозином, Ув. 600.

ный стаз, а также незначительное присутствие сладжированных эритроцитов (рис. 1, «Б»). Количество форменных элементов крови в плодных сосудах умеренное, стаза крови не отмечено, редко встречаются пустые капилляры. Обращает внимание на себя тот факт, что парентеральное введение как суспензий наночастиц золота размеров, так и равного им объёма физиологического раствора обуславливает тенденцию к снижению относительной площади стромы трофобластических балок лабиринтной зоны плаценты. Для плацент животных, которым вводили суспензию частиц размером 5 нм и 150 нм различия статистически значимы (табл. 2). Это явление, вероятно, обусловлено более высоким уровнем давления материнской крови. Бессосудистые балки в полученных нами препаратах не обнаружены.

Таким образом, введение в кровоток беременных самок белых лабораторных крыс с гемохориальным типом плаценты суспензий наночастиц золота разной величины вызывает в её лабиринтной зоне ряд морфологических изменений, которые не имеют специфического характера. Изменения сводятся к морфологическим проявлениям нарушения кровообращения, полнокровия, эритроцитарного стаза, расширения материнских лакун. Судя по степени выраженности этих реакций, они, скорее всего, обусловлены не собственно самими наночастицами, как препарата золота, а введением некоторого дополнительного объема жидкости в кровоток беременной самки, нарушающей общую гемодинамику. Критическим размером, ограничивающим проницаемость наночастиц через тканевые барьеры плаценты, является величина в 150 нм.

Наноразмерные объекты могут служить в ка-

честве потенциального инструмента для управления процессами морфогенеза [8]. Исследование их проницаемости для тканевых барьеров является ключевым вопросом в разработке способов их применения [9, 10]. Практическое использование результатов этих исследований может стать основой создания нано-фармацевтических препаратов с селективной проницаемостью и накоплением в тканях для регуляции морфогенетических процессов, пренатальной диагностики и лечения. Полученные нами данные свидетельствуют о перспективности использования селективной размерной проницаемости наночастиц золота для целей тераностики (одномоментной терапии и диагностики) в период беременности, а также для исследования фундаментальных механизмов проницаемости тканевых барьеров у животных и человека.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nature Nanotechnology*. 2011;6:P. 321–328.
2. Dykman L, Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspective. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41:2256–2282.
3. Adair VM. Nanoparticle vaccines against respiratory viruses. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2009;1:405–414.
4. Menjoge AR, Rinderknecht AL, Navath RS, Faridnia M et al. Transfer of PAMAM dendrimers across human placenta: prospects of its use as drug carrier during pregnancy. *J. Control Release.* 2011;150(3):326–338.
5. Шубина О.С., Грызлова Л.В. Характеристика гемато-плацентарного барьера плаценты белых

крыс при беременности// Морфологические ведомости. – 2006. – № 1–2. – С. 78–80.

6. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. - М.: Медицина, 1990. - 384 с.

7. Цыганова Н.А., Хайруллин Р.М., Терентюк Г.С., Ерыков С.Н. Сравнительный анализ применения гистохимических методик для выявления золота во внутренних органах при внутривенном введении коллоидных растворов его наночастиц// Морфологические ведомости. – 2012. – № 4. – С. 85–89.

8. Arias JL. *Nanotechnology and Drug Delivery*. Boca Raton-London-Ney-York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2015. 368pp.

9.9. Tsyganova NA, Khayrullin RM, Terentyuk GS, Khlebtsov BN, Bogatyrev VA, Dykman LA, Erykov SN, Khlebtsov NG. Penetration of pegylated gold nanoparticles through rat placental barrier. *Bull of Exp Biol and Med*. 2014 July 29; 157(3):383–85.

10.10. Khayrullin R, Mikheeva N, Terentyuk G, Mikheev V. The permeability of some blood-tissue barriers for PEGylated gold nanoparticles at use of parenteral injection/ 5th International Conference on Nanotek and Expo, November 16–18, 2015, San Antonio, USA. - doi: 10.13140/RG.2.1.3843.1206

Авторская справка:

1. Михеева Наталья Александровна, к.б.н., доцент кафедры биологии, экологии и природопользования, 432017, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42, Ульяновский государственный университет, тел.: + 7 (908) 472 97 19, e-mail: tcyganovana@mail.ru

2. Хайруллин Радик Магзинурович, д.м.н., профессор, зав. кафедрой анатомии человека, 432017, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42, Ульяновский государственный университет, тел. +7 (842) 232 65 65, e-mail: prof.khayrullin@gmail.com

3. Терентюк Георгий Сергеевич, д.б.н., профессор кафедры анатомии человека, 432017, г. Ульяновск, ул. Льва Толстого, 42, Ульяновский государственный университет, тел.: +7 (842) 232 65 65, e-mail: vetklinika@front.ru

4. Михеев Вячеслав Аркадьевич, к.б.н., доцент кафедры биологии и химии, 432063, г. Ульяновск, ул. архитектора Ливчака 2, кафедра биологии и биоэкологии, тел.: + 7 (908) 472 97 19, e-mail: karaha@mail.ru