

РАЗДЕЛ 3 – МОРФОМИКА – НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ PART 3 – MORPHOMICS – NEW TECHNOLOGIES

ВЛИЯНИЕ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ РАЗЛИЧНОГО ДИАМЕТРА НА ПРЕНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ БЕЛЫХ КРЫС

Михеева Н.А.

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия, e-mail: tcyganovana@mail.ru

THE INFLUENCE OF GOLD NANOPARTICLES OF DIFFERENT DIAMETER ON THE PRENATAL DEVELOPMENT OF WHITE RATS

Mikheeva NA

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia, e-mail: tcyganovana@mail.ru

Для цитирования:

Михеева Н.А. Влияние золотых наночастиц различного диаметра на пренатальное развитие белых крыс// Морфологические ведомости. - 2017. - Том 25. - № 4. - С. 33-36. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.17\(25\).04.33-36](https://doi.org/10.20340/mv-mn.17(25).04.33-36)

For the citation:

Mikheeva NA. The influence of gold nanoparticles of different diameter on the prenatal development of white rats. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological Newsletter. 2017 Dec 30;25(4):33-36. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.17\(25\).04.33-36](https://doi.org/10.20340/mv-mn.17(25).04.33-36)

Резюме: В работе изучено влияние разного золотых наночастиц диаметра на пренатальный морфогенез белых крыс. Золотые наночастицы диаметром 5, 10, 30, 50 и 150 нм, покрытые полиэтиленгликолем, вводили внутривенно беременным самкам белых крыс на 15 день гестации в дозе 2,0 мл на кг массы животного (в среднем 0,5-0,7 мл на животное) в виде суспензии (концентрация 57 мкг золота на мл; в среднем 28-40 мкг на животное). Наличие золотых наночастиц в тканях визуализировали методом аутометаллографии нитратом серебра, а общее содержание золота в плодах оценивали методом атомной адсорбционной спектроскопии. Установлена проницаемость гемохориального барьера для частиц диаметрами 5, 10, 30 и 50 нм. Макро- и микроскопический анализы плодов и новорожденных крысят свидетельствуют об отсутствии морфогенетического, тератогенного и эмбриолетального влияния при однократном введении беременным крысам в парентеральных дозах 114 мкг/кг/сут в период позднего органогенеза. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения золотых наночастиц диаметром до 150 нм для диагностических и терапевтических целей (тераностики) во время беременности.

Ключевые слова: тераностика, наночастицы золота, гематоплацентарный барьер, пренатальный морфогенез

Summary: The effect of different diameter gold nanoparticles on the prenatal morphogenesis of white rats was studied. Gold nanoparticles 5, 10, 30, 50 and 150 nm in diameter covered with polyethylene glycol were administered intravenously to pregnant female white rats on the 15th gestation day at a dose of 2.0 ml per kg of animal weight (an average of 0.5-0.7 ml per animal) in the form of a suspension (concentration of 57 µg gold per ml, an average of 28-40 µg per animal). The presence of gold nanoparticles in tissues was visualized by the method of autometallography with silver nitrate, and the total gold content in the fetuses was estimated by atomic adsorption spectroscopy. The permeability of the hemochoric barrier for particles with diameters of 5, 10, 30, and 50 nm was established. Macro- and microscopic analyzes of fetuses and newborn rats indicate the absence of morphogenetic, teratogenic and embryo-lethal effects when administered single-fold to pregnant rats at parenteral doses of 114 mcg / kg / day during late organogenesis. The obtained data testify to the prospects of using gold nanoparticles up to 150 nm in diameter for diagnostic and therapeutic purposes (thernostics) during pregnancy.

Key words: teranostics, gold nanoparticles, hematoplacental barrier, prenatal morphogenesis

Введение. Многочисленными исследованиями установлено, что пренатальный онтогенез является наиболее чувствительным и уязвимым, а воздействие ксенобиотиков в этот период может привести к нарушению формирования органов и всего организма в целом, а также к необратимым отдаленным последствиям. В то же время пренатальный период предоставляет возможность для коррекции и управления онтогенезом. В последние годы наноразмерные материалы все больше получают широкое применение в фундаментальных и прикладных биомедицинских исследованиях [1, 2]. Среди наноразмерных материалов, используемых для диагностических и терапевтических целей, активно используются наночастицы золота, у которых всесторонне изучены токсичность, биораспределение и биофизические свойства. К сожалению, исследования по определению влияний золотых наночастиц (далее – ЗНЧ) на живые объекты не касаются исследований по выявлению степени их эмбриотоксичности и возможной тератогенности, в то время как нанофармацевтика могла бы предложить препараты с селективным накоплением в тканях для регуляции морфогенетических процессов, пренатальной диагностики или лечения.

Целью исследования явилось изучение влияния золотых наночастиц разного диаметра на пренатальный морфогенез белых крыс.

Материалы и методы исследования. Эксперимент был проведен на самках белых беспородных лабораторных крыс, которым на 15-е сутки беременности в хвостовую вену вводили 2,0 мл на кг массы животного (в среднем 0,5-0,7 мл на животное) суспензии ЗНЧ, покрытых полиэтиленгликолем (далее – ПЭГ), с концентрацией 57 мкг золота (Au) на кг животного и средним диаметром 5, 10, 30, 50 и 150 нм. Используемые в исследовании ЗНЧ были синтезированы в лаборатории биосенсоров и наноразмерных структур ИБФРМ РАН (г. Саратов, руководитель – 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 [3]. Следующей группе экспериментальных животных на 15-е сутки беременности вводили физиологический раствор аналогичного объема. Кроме того, была

сформирована интактная группа животных. Каждая группа была представлена не менее 6 животными. Дополнительно в каждую экспериментальную группу входило 2 беременные самки, которых не умерщвляли, а оставляли до естественных родов, наблюдая в дальнейшем за потомством. Через сутки после введения ЗНЧ 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 ВО «Ульяновский государственный университет» Минобрнауки РФ. Для оценки проницаемости гематоплацентарного барьера ЗНЧ использовали метод атомной адсорбционной спектроскопии (ААС, прибор Dual Atomizer Zeeman AA spectrometer iCE 3500, Thermo Scientific Inc., USA), позволивший определить концентрацию золота в плодах. Для визуализации накопления ЗНЧ в клеточных и тканевых структурах плодов применяли метод автоматаллографии нитратом серебра на парафиновых гистологических срезах в собственной модификации [4].

При вскрытии животных из матки изымали плоды вместе с плацентой, не нарушая пупочного канатика, проводили осмотр, определяли возможные изменения или пороки развития, цвет покровов и снимали массометрические показатели плодов. Для морфологического исследования плоды препарировали и 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. Изучали гистологические особенности печени, почек, селезенки и головного мозга плодов. Описание и сравнительно-морфологический анализ на постоянных микропрепаратах проводили с помощью бинокулярного микроскопа Motis B3 (Motis, KHP) при увеличениях 10X60 и 10X100. Для животных, которые оставались под наблюдением, после естественных родов определяли параметры физического развития извлеченных плодов (масса и длина тела, длина хвоста), кроме этого подсчитывали число неразвивающихся или мертвых плодов, по чему судили о фетальной смертности.

Результаты исследования и обсуждение. Гематоплацентарный барьер хориального типа оказывается проницаемым для ЗНЧ диаметром 5, 10, 30 и 50 нм - методом атомной адсорбционной спектроскопии (далее – ААС) установлено, что общее содержание ЗНЧ указанных диаметров в плодах экспериментальных групп животных в среднем достоверно превышает таковое плодов контрольной группы после внутривенного введения суспензии ЗНЧ матери [5]. Применение метода автоматаллографии позволило нам оценить основное местоположение ЗНЧ в плодах – частицы золота определяются в их печени и селезенке. Согласно полученным данным, плацентарный барьер оказывается непроницаемым для 150-нм ЗНЧ – ни ААС, ни применение метода автоматаллографии не позволило определить ЗНЧ в тканях плодов. Введение ЗНЧ не вызывает изменений в физическом развитии плодов: статистически значимых различий в массе тела между плодами, полученных от беременных животных, подвергшихся введению ЗНЧ всех исследуемых диаметров, и контрольными или интактными животными не обнаружены (табл. 1, $p > 0,05$).

Таблица 1

Органометрические показатели плодов белых крыс на 16-е сутки развития в норме и при введении беременным самкам препаратов наночастиц золота разной величины

Показатель	Число плодов на 1 самку	Масса плода (г)
Экспериментальная группа		
интактная	10±1	2,93±0,09
контрольная	12±2	2,91±0,07
опытная - 5 нм	11±2	2,98±0,10
опытная - 10 нм	11±1	3,00±0,13
опытная - 30 нм	13±1	2,93±0,11
опытная - 50 нм	9±1	2,96±0,09
опытная - 150 нм	12±1	2,94±0,07

При макроскопическом исследовании у плодов, полученных от беременных животных, подвергшихся введению ЗНЧ всех исследуемых диаметров, не отмечалось внешних аномалий в развитии лицевого отдела и конечностей, нарушения анатомической структуры скелета. Парентеральное введение беременным крысам ЗНЧ диаметром 5-50 нм в период позднего органогенеза (15-е сутки гестации) не вызывает каких-либо врожденных аномалий развития внутренних органов плодов – морфология печени, селезенки, почек и головного мозга плодов контрольной группы и плодов крыс, подвергшихся воздействию раствора ЗНЧ диаметрами 5, 10, 30, 50 и 150 нм, не имеет существенных различий и соответствует 14-16-ым суткам внутриутробного развития крыс. В частности, печень плодов всех групп животных, представлена скоплениями гепатоцитов, несформированных в балки, среди которых расположены многочисленные очаги кроветворения (рис. 1). Центральные вены определяются редко. Для печени плодов интактной группы характерно более упорядоченное расположение комплексов гепатоцитов. В селезенке плодов всех групп животных отсутствует дифференцировка на красную и белую пульпы – лимфатические узелки не определяются, клетки лимфоидного ряда расположены диффузно. Присутствие единичных мегакариоцитов указывает на экстрамедуллярное кроветворение. Существенных различий в гистоморфологии селезенки плодов крыс, подвергшихся воздействию раствора ЗНЧ диаметрами 5, 10, 30, 50 и плодов контрольной и интактной группы не обнаружены.

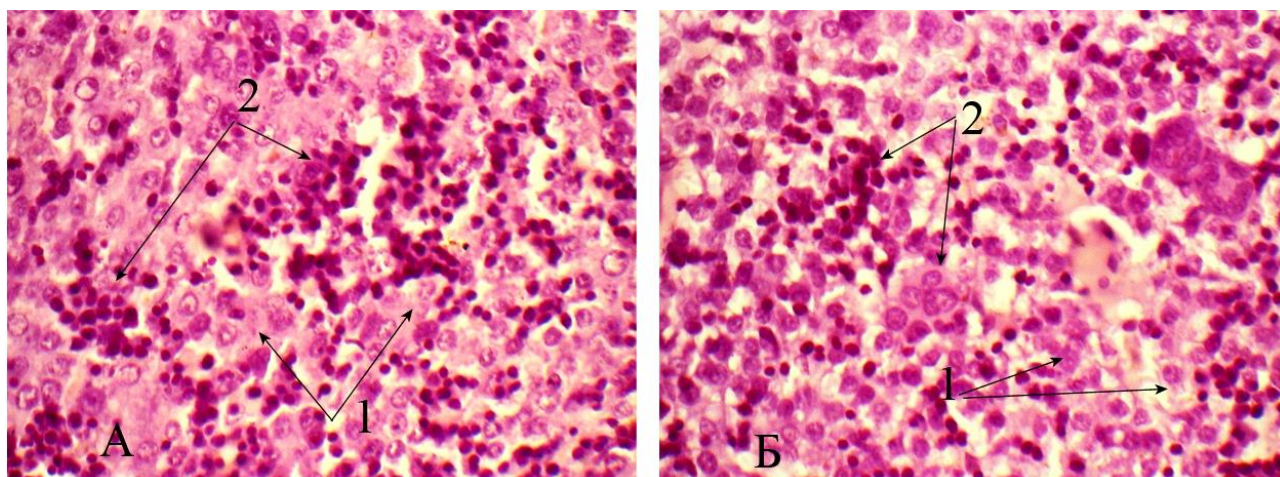


Рис. 1. Печень плодов крысы на 15-й день развития: А – через сутки после введения самкам физраствора, Б – через сутки после введения самкам раствора ЗНЧ диаметром 50 нм; 1 – печеночные клетки, 2 – очаги кроветворения. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: $\times 600$.

Головной мозг плодов крыс представлен мозговыми пузырями с довольно широкой полостью. Стенка переднего мозгового пузыря толстая, образованная несколькими слоями малодифференцированных делящихся клеток. На 16-е сутки пренатального развития почки плодов всех экспериментальных групп характеризуются тонким корковым веществом, не четко сформированными пирамидами. Почечные тельца маленькие, плотно расположены, проксимальные и дистальные отделы извитых канальцев четко не дифференцируются. Большинство клубочков не функционируют (рис. 2).

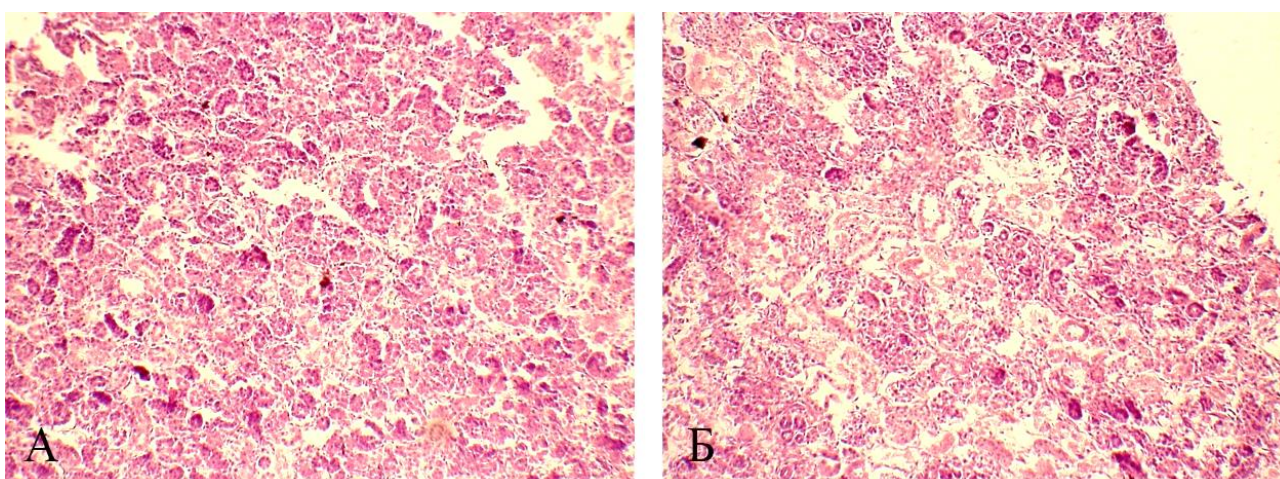


Рис. 2. Почки плодов крысы на 15-й день развития: А – через сутки после введения самкам физраствора, Б – через сутки после введения самкам раствора ЗНЧ диаметром 30 нм. Окр. гематоксилином и эозином. Ув.: $\times 120$.

Таблица 2

Физиометрические показатели новорожденных крысят в норме и при введении беременным самкам препаратов наночастиц золота разной величины в период позднего органогенеза (15-е сутки)

Показатель Экспериментальная группа	Масса (г)	Длина хвоста (мм)	Число крысят в помете	Число мертворожденных крысят
интактная	$5,71 \pm 0,10$	$22 \pm 0,01$	10 ± 1	0
контрольная	$5,48 \pm 0,04$	$22 \pm 0,00$	11 ± 2	0
опытная - 5 нм	$5,61 \pm 0,05$	$21 \pm 0,002$	11 ± 1	0
опытная - 10 нм	$5,22 \pm 0,01$	$22 \pm 0,01$	12 ± 1	0
опытная - 30 нм	$5,37 \pm 0,01$	$22 \pm 0,01$	10 ± 1	0
опытная - 50 нм	$5,48 \pm 0,09$	$22 \pm 0,00$	10 ± 1	0
опытная - 150 нм	$5,73 \pm 0,09$	$22 \pm 0,01$	11 ± 1	0

На поверхности и в паренхиме всех изученных органов отсутствовали кровоизлияния и не отмечались признаки некротического явления. Оценка общего состояния крыс также не выявила каких-либо симптомов токсического действия ЗНЧ на беременных самок на всем протяжении эксперимента [5].

Неблагоприятное действие ксенобиотиков в эмбриональный период реализуется через нарушение закладки жизненно важных органов у эмбрионов и последующей их гибели [6]. Как показывают некоторые исследования наночастицы различной химической природы могут оказывать эмбриотоксическое и органотропное воздействие на развитие потомства лабораторных животных [7]. Однако в наших предыдущих исследованиях и настоящем исследовании, как в опытной, так и в контрольной группах крыс не отмечалось случаев мертворождения (табл. 2), что свидетельствует об отсутствии эмбриолетального действия у растворов ЗНЧ в данной концентрации. Полученные результаты указывают на то, что парентеральное введение ЗНЧ диаметрами от 5 до 50 нм беременным самкам в период позднего органогенеза (15-е сутки гестации) не оказывает влияния на показатели физического развития - фетометрические показатели как в контрольной, так и опытной группе значимо не отличались. Данный факт указывает на отсутствие отрицательного действия ЗНЧ на пренатальное развитие крыс. У новорожденных крысят как контрольной, так и опытной групп отсутствовали кровоизлияния, отеки кожных покровов и внешние аномалии развития. Дальнейшие наблюдения за животными, которые внутриутробно получали ЗНЧ, не выявили каких-либо отклонений в их развитии или поведении, при достижении половозрелости и самки и самцы спаривались, оставляя жизнеспособное потомство.

Заключение. Таким образом, ЗНЧ диаметрами от 5 до 50 нм не оказывает морфогенетического, тератогенного и эмбриолетального влияния у крыс при однократном введении беременным самкам в парентеральных дозах 80 мкг/кг/сут в период позднего органогенеза. Данный факт свидетельствует о перспективности применения ЗНЧ диаметром до 150 нм для диагностических и терапевтических целей, т.е. тераностики во время беременности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dykman L, Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspective// Chem. Soc. Rev.- 2012.- Vol. 41.- P. 2256–2282.
2. Терентюк Г.С., Хлебцов Б.Н., Дыкман Л.А., Суетенков Д.Е., Рыжова М.В., Хайруллин Р.М., Хлебцов Н.Г. Кинетика разных типов золотых наночастиц при парентеральном введении и морфологические изменения внутренних органов// Морфологические ведомости.- 2011.- № 3.- 77-82.
3. Шубина О.С., Грызлова Л.В. Характеристика гемато-плацентарного барьера плаценты белых крыс при беременности// Морфологические ведомости.- 2006.- № 1–2.- С. 78–80.
4. 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.
5. Михеева Н.А., Хайруллин Р.М., Терентюк Г.С., Михеев В.А. Морфологические реакции лабиринтной зоны плаценты белых крыс на парентеральное введение золотых наночастиц разного диаметра// Морфологические ведомости.- 2015.- № 3.- С. 115-118.
6. Динерман А.А. Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития.- М.: Медицина, 1980.- 191с.
7. Шарафутдинова Л.А., Хисматуллина З.Р., Даминов М.Р., Валиуллин В.В. Исследование эмбриотоксического действия наночастиц диоксида титана на крыс// Морфологические ведомости.- 2017.- Том 25.- № 3.- С. 37-42.

REFERENCES

1. Dykman L, Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspective// Chem. Soc. Rev.- 2012.- Vol. 41.- P. 2256–2282.
2. Terentyuk G.S., Khlebtsov B.N., Dykman L.A., Suetenkov D.E., Ryzhova M.V., Khayrullin R.M., Khlebtsov N.G. Kinetika raznykh tipov zolotykh nanochastits pri parenteral'nom vvedenii i morfologicheskie izmeneniya vnutrennikh organov// Morfologicheskie vedomosti.- 2011.- № 3.- 77-82.
3. Shubina O.S., Gryzlova L.V. Kharakteristika gemato-platsentarnogo bar'era platsenty belykh kryss pri beremennosti// Morfologicheskie vedomosti.- 2006.- № 1–2.- S. 78–80.
4. Tsyganova N.A., Khayrullin R.M., Terentyuk G.S., Erykov S.N. Sravnitel'nyy analiz primeneniya gistokhimicheskikh metodik dlya vyyavleniya zolota vo vnutrennikh organakh pri vnutrivennom vvedenii kolloidnykh rastvorov ego nanochastits// Morfologicheskie vedomosti.- 2012.- № 4.- S. 85-89.
5. Mikheeva N.A., Khayrullin R.M., Terentyuk G.S., Mikheev V.A. Morfologicheskie reaktsii labirintnoy zony platsenty belykh kryss na parenteral'noe vvedenie zolotykh nanochastits raznogo diametra// Morfologicheskie vedomosti.- 2015.- № 3.- S. 115-118.
6. Dinerman A.A. Rol' zagryazniteley okruzhayushchey sredy v narushenii embrional'nogo razvitiya.- M.: Meditsina, 1980.- 191s.
7. Sharafutdinova L.A., Khismatullina Z.R., Daminov M.R., Valiullin V.V. Issledovanie embriotoksicheskogo deystviya nanochastits dioksida titana na kryss// Morfologicheskie vedomosti.- 2017.- Tom 25.- № 3.- S. 37-42.

Авторская справка

Цыганова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биологии, экологии и природопользования, докторант кафедры анатомии человека, Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия; e-mail: tcyganovana@mail.ru