

Ю.Бурлака, науч. сотр., Н. Гринь, науч. сотр., С.Верева, д-р биол. наук
ГУ "Институт отоларингологии им. проф. А.С. Коломийченко НАМН Украины", Киев, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ГОРТАНИ

Исследовали агрегационную функцию тромбоцитов у больных с разными стадиями рака гортани для выявления наиболее показательных нарушений и определения наиболее информативных отличий. Проведена сравнительная оценка показателей агрегации тромбоцитов в плазме крови больных раком гортани по сравнению данными в контрольной группе условно здоровых лиц. Установлено усиление АДФ ряда показателей агрегации тромбоцитов при всех использованных концентрациях индуктора. При III-й стадии онкологического процесса наряду с увеличением количества лиц с гиперагрегацией тромбоцитов отмечали достоверное уменьшение в крови количества тромбоцитов и увеличение числа лиц с тромбоцитопенией. У больных с II-ой и III-й стадиями рака гортани наблюдаются значительные изменения степени, скорости и времени агрегации в сторону увеличения их уровней относительно соответствующих контрольных данных. Наиболее существенные нарушения отмечаются при II-й стадии онкологического процесса.

Ключевые слова: рак гортани, тромбоциты, агрегация, аденозиндифосфат.

Iu. Burlaka, fellow researcher, N. Gryn', fellow researcher, S. Verevka, head of laboratory, Dr.Sci. Biol
National Academy of Medical Sciences of Ukraine prof. O.S. Kolomyichenko Institute of Otolaryngology, Kyiv, Ukraine

INVESTIGATION OF PLATELET AGGREGATION IN PATIENTS WITH LARYNGEAL CANCER

A comparative study of the induced platelet aggregation in patients with laryngeal cancer to determine the most revealing informative violations. It was compared evaluation of results of platelet aggregation in the blood plasma of patients with laryngeal cancer compared to the healthy persons. It was found intensification of ADP induced platelet aggregation in the concentration range which was used. At the same time with the increase the number of patients with platelet hyperaggregation reliable platelet decrease in blood and increase of patients with thrombocytopenia at the III-rd stage of laryngeal cancer are observed. In patients with II-nd and III-rd stage of laryngeal cancer was found increase in the level, rate and aggregation time compared to the healthy persons. The most significant violations observed in the II-nd stage of the cancer process.

Keywords: laryngeal cancer, platelet, aggregation, ADP.

УДК [57.044:546.59]:591.463.2

В. Калиновський, асп., А. Пустовалов, канд. біол. наук, М. Держинський, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ,
Г. Гродзюк, канд. хім. наук, Н. Андрюшина, канд. хім. наук
ТОВ "Наномедтех", Київ

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ТА ЙОНІВ ЗОЛОТА НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СІМ'ЯНИКІВ СТАТЕВОНЕЗРІЛИХ ЩУРІВ

Досліджували вплив золота у формі колоїду та солі на функціонування сім'яників статевонезрілих щурів. Встановлено, що йони золота стимулюють проліферативні процеси в сперматогенному епітелії, а також підвищують функціональну активність інтерстиціальних клітин. Наночастинки золота, навпаки, пригнічували ендокринну функцію сім'яника, а також гальмували статево дозрівання. Таким чином, не зважаючи на стимулюючий характер солі золота, при переході до нанорозмірного класу цей метал набуває токсичних властивостей.

Ключові слова: Наночастинки, золото, сім'яник.

Вступ. Препарати золота традиційно застосовуються для лікування аутоімунних захворювань, у першу чергу ревматоїдного артриту [14]. Хоча золото традиційно вважається металом з низькою біологічною активністю, у ряді досліджень було показано можливість його накопичення в ендокринних органах [12]. Дані ж щодо впливу солей золота на активність репродуктивної системи є суперечливими [4].

Наночастинки золота є перспективним матеріалом сучасної нанобіотехнології та наномедицини. Специфічні фізико-хімічні властивості зумовлюють розробку підходів щодо застосування нанорозмірного золота у різноманітних системах детекції [11], для розробки вакцин [13], адресної доставки лікарських засобів, фототермальної терапії онкологічних захворювань [5, 6]. Але широке застосування наночастинок золота у медицині обмежене потенційним токсичним впливом цього агента. У дослідженнях *in vitro* було показано можливість ушкодження різних клітин внаслідок дії колоїдного золота [9]. В той же час літературні і дані щодо подібних досліджень *in vivo* є дуже обмеженими, особливо це стосується дослідження репродуктивної токсичності наноматеріалів [10]. Зважаючи на те, що у дослідженнях фармакокінетики наночастинок золота було показано можливість перетину ними гематотестикулярного бар'єру, питання впливу препаратів колоїдного золота на процеси сперматогенезу та тестикулярного стероїдогенезу є вкрай актуальним [3].

Тому метою нашої роботи було порівняння впливу йонів та наночастинок золота на репродуктивну систему статевонезрілих самців щурів.

Матеріали і методи. Розчини наночастинок золота отримували шляхом відновлення тетрахлораурату (III) натрію (NaAuCl_4) аскорбіновою кислотою у лужному середовищі, у присутності поліфосфату натрію. Для цього у водний розчин Au^{3+} 1×10^{-3} моль/л додавали, при інтенсивному перемішуванні, $2,5 \times 10^{-4}$ моль/л водного розчину поліфосфату натрію, 1×10^{-2} моль/л гідроксиду натрію та 1×10^{-3} моль/л аскорбінової кислоти. Перемішування продовжували протягом 10 хв. Отримані колоїди зберігали при кімнатній температурі без попадання прямих сонячних променів. Розчин наночастинок досліджували методом растрової електронної мікроскопії за допомогою растрового мікроскопа LMU Mira3 Tescan (Tescan a.s., Чеська Республіка) при напрузі прискорення 5–20 кВ. Мікроскоп був обладнаний приставкою Oxford X-MAX 80 мм для енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії (Oxford Instruments, США). Розмір отриманих частинок визначали методом лазерної фотокореляційної спектроскопії здійснювали на приладі Zeta Sizer Nano S (Malvern, Великобританія). Колоїди опромінювали гелій-неоновим лазером з $\lambda = 633$ нм, розсіяне світло реєстрували під кутом 173° .

Дослідження проведено на 32 самцях білих нелінійних щурів з початковою масою 80-100 г. Вік тварин на початку експерименту становив 21 день, що відповідає віку статевонезрілих тварин. Щурів утримували в умовах віварію на стандартному раціоні.

Методом рандомізації тварин було розподілено на 4 групи по 8 тварин. Тваринам I групи (контроль 1) вводили 0,9% розчин NaCl ("Індар", Україна) з розрахунку 0,1 мл / 100 г маси щура. Тваринам II групи (контроль 2) вводили розчин, що складався з $2,5 \times 10^{-4}$ моль/л водного розчину поліфосфату натрію, 1×10^{-2} моль/л гідроксиду натрію та 1×10^3 моль/л аскорбінової кислоти (0,1 мл розчину / 100 г маси щура). Тваринам III та IV груп вводили розчини NaAuCl_4 та наночастинок золота відповідно з розрахунку 0,1 мг золота/100 г маси щура. Всі препарати вводили інтраперитонеально протягом 10 діб.

На 10 добу тварин декапітували, лівий сім'яник фіксували у рідині Буена та заливали у парафін за стандартною гістологічною методикою [1]. Зрізи товщиною 8 мкм забарвлювали гематоксиліном Бюмера та еозинном. Гістологічні препарати аналізували на мікроскопі Olympus BX51 (Японія), обладнаного цифровою фотокамерою Camedia C-5050 zoom і програмним забезпеченням Olympus DP Soft 3.2. Для оцінки морфологічного стану сім'яників визначали діаметр звивистих сім'яних каналців, висоту сперматогенного епітелію та площу поперечного перерізу ядер інтерстиціальних клітин Лейдіга [1].

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Statistica 6.0. Дані презентували як середнє \pm похибка середнього ($M \pm m$). Для оцінки нормальності розподілу даних використовували W критерій Шапіро-Уїлка. Оскільки всі отримані нами дані були розподілені нормально, різницю між середніми оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента. Значущими вважали відмінності при $P \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Колоїдні розчини наночастинок золота були стабільними протягом не менше ніж двох тижнів. Розміри наночастинок складали 7,5-12,5 нм (рис. 1).

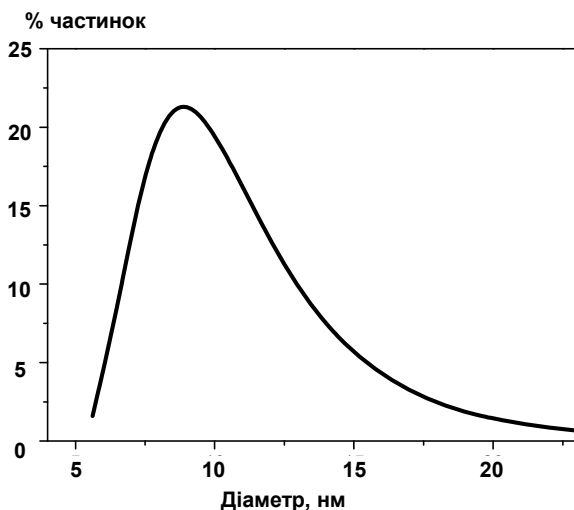


Рис 1. Розподіл наночастинок за гідродинамічним розміром, визначений методом лазерної фотокореляційної спектроскопії

При дослідженні сім'яників тварин контрольної групи (контроль 1) було встановлено, що діаметр звивистих

сім'яних каналців дорівнював $87,23 \pm 1,12$ мкм, а висота сперматогенного епітелію складала $36,52 \pm 0,48$ мкм. Якісно стінка каналця складалась з шару сперматогоній, 1-2 шарів сперматоцитів та 1-2 шарів круглих сперматид. Такий клітинний склад свідчить про незавершеність процесу статевого дозрівання. Площа поперечного перерізу клітин Лейдіга становила $17,38 \pm 0,37$ мкм². Морфологічно межі інтестиціальних клітин були слабо помітні, ядра помірно базофільні, містять одне ядрце та невелику кількість пристінкового гетерохроматину. Ці ознаки свідчать про помірний рівень функціональної активності ендокринної частини сім'яника [4].

Введення розчину поліфосфату натрію (контроль 2) не призвело до виникнення якісних змін, порівняно з групою контроль 1. Морфометричні показники в даній групі становили: діаметр звивистих сім'яних каналців – $86,52 \pm 0,92$ мкм, висота сперматогенного епітелію – $35,93 \pm 0,41$ мкм, площа перерізу ядер клітин Лейдіга – $17,75 \pm 0,33$ мкм². Всі наведені параметри не відрізняються від показників групи контроль 1. Враховуючи вищезазначене, можна стверджувати, що виявлені нам біологічні ефекти зумовлені дією саме золота.

Введення розчину NaAuCl_4 протягом 10 діб призвело до достовірного зростання висоти сперматогенного епітелію ($39,15 \pm 0,57$ мкм) та діаметру звивистих каналців ($103,23 \pm 1,45$ мкм) (рис. 2). Морфологічно це проявлялось у значному збільшенні кількості клітин сперматогенного ряду: в залежності від стадії сперматогенезу в каналці можна було знайти 3-4 шари круглих сперматид, або шар видовжених сперматид. В той же час дозрілих сперматозоїдів не було виявлено у жодному з каналців. Такі результати свідчать про прискорення темпів статевого дозрівання, хоча воно ще не дійшло завершення [1]. Клітини Лейдіга характеризувались великим світлим ядром, гетерохроматину майже не було помітно, площа поперечного перерізу ядра становила $19,26 \pm 0,48$ мкм², що достовірно відрізняється від відповідного показника групи контроль 2. Подібні результати були отримані у досліджах Biswas і співавт. [2] – автори пов'язують стимулюючий ефект солей золота з активацією тестикулярних гідроксистероїд-дегідрогеназ, хоча точний механізм цього явища залишається невідомим.

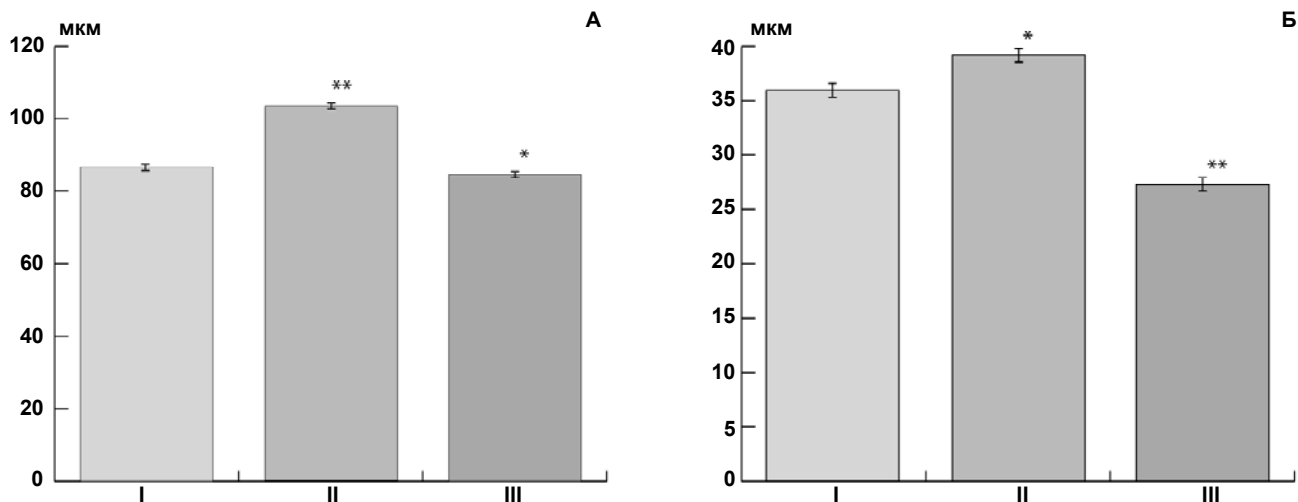


Рис 2. Діаметр звивистих сім'яних канальців (А) та висота сперматогенного епітелію (Б) статевонезрілих щурів, яким вводили сіль та наночастинки золота:

I – контроль 2, II – введення солі золота, III – введення наночастинок золота (n=8)

* – відмінності від контрольної групи достовірні при $P \leq 0,05$; ** – відмінності від контрольної групи достовірні при $P \leq 0,01$.

При аналізі сім'яних залоз тварин, яким вводили розчин наночастинок золота, було встановлено, що діаметр звивистих сім'яних канальців становив $84,55 \pm 0,99$ мкм, а висота сперматогенного епітелію – $27,30 \pm 0,39$ мкм. Обидва показники є достовірно нижчими за відповідні показники тварин контрольних груп. Не зважаючи на те, що наночастинки золота можуть пошкоджувати гематотестиккулярний бар'єр з наступними патологічними змінами органу, при морфологічному аналізі стінки звивистих

канальців не було виявлено яких-небудь патологічних змін, які вказували б на структурні пошкодження [8]. Серед сперматогенних клітин часто були відсутні сперматиди, сперматозоїдів виявлено також не було. Ядра клітин Лейдіга виглядали конденсованими, зафарбовувались базофільно. Площа їхнього поперечного перерізу склала $15,78 \pm 0,38$ мкм², що достовірно менше відповідного параметру контрольних груп (рис. 3).

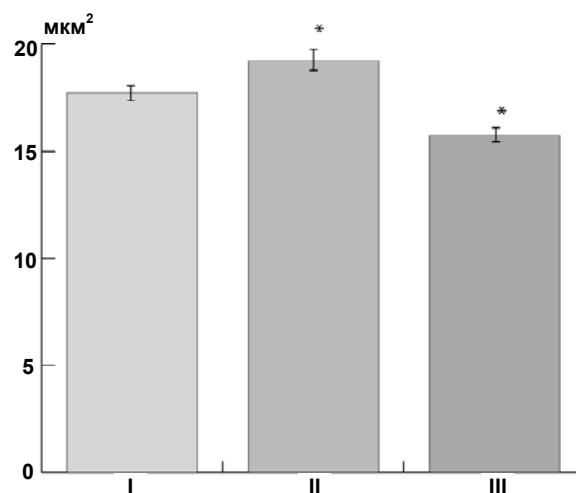


Рис 3. Площа поперечного перерізу ядер клітин Лейдіга статевонезрілих щурів, яким вводили сіль та наночастинки золота:

1 – введення розчину контроль 2, 2 – введення солі золота, 3 – введення наночастинок золота (n=8)

* – відмінності від контрольної групи достовірні при $P \leq 0,05$.

Вищенаведені ознаки свідчать про сповільнення сперматогенезу та зниження функціональної активності сім'яних залоз. В дослідях на дорослих мишах Li та співав. показали, що введення наночастинок золота, модифікованих поліетиленгліколем призвело до порушення в роботі ендокринної частини сім'яника без впливу на сперматогенез [7]. Автори пов'язують такий ефект із порушенням роботи органа внаслідок безпосереднього накопичення наночастинок в клітинах Сертолі та інтерстиціальних клітинах.

Отже, введення солі золота протягом 10 діб призвело до зростання функціональної активності сім'яників, а введення колоїдного розчину – до зменшення.

Висновки. Отримані нами результати свідчать, що, не зважаючи на стимулюючий вплив золота у формі йонів, наночастинки золота є токсичними для репродуктивної системи статевонезрілих щурів. Враховуючи здатність даних наночастинок накопичуватись в сім'яних залозах, слід уважніше підходити до використання колоїдних розчинів золота у клінічній практиці.

Список використаної літератури

1. Матвієнко М.Г. Тестикулярна активність молодих, зрілих і старих щурів після введення празозину та мезатону при блокаді й активації кіспептинергічної системи / М.Г. Матвієнко, А.С. Пустовалов, М.Е. Держинський // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2012. – Т.114, Вип 6. – С. 66–78.
2. Морфофункціональні зміни в тестикулах щурів 24-місячного віку під впливом кіспептина на фоні блокади та активації альфа-адренорецепторів і при введенні мелатоніна / М. Матвієнко, А. Пустовалов, Н. Бузинська [та ін.] // Вісник проблем біології та медицини. – 2012. – Т.95, № 2. – С. 170-173.
3. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats / S. Balasubramanian, J. Jittiwat, J. Manikandan [et al.] // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31, No 8. – P. 2034-2042.
4. Biswas N. Effects of gold on testicular steroidogenic and gametogenic functions in immature male albino rats / N. Biswas, A. Chattopadhyay, M. Sarkar // Life Sci. – 2004. – Vol.76. – P. 629-36.
5. Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells / M. Eghtedari, A. Liopo, J. Copland [et al.] // Nano Lett. – 2009. – Vol. 9, No 1. – P. 287-91.
6. Gold Nanoparticle-Mediated Detection of Circulating Cancer Cells / K. Bhattacharyya, B. Goldschmidt, M. Hannink [et al.] // Clin Lab Med. – 2012. – Vol.32, No 1. – P. 89-101.
7. Gold nanoparticles elevate plasma testosterone levels in male mice without affecting fertility / W. Li, F. Wang, z. Liu [et al.] // Small. – 2013. – Vol. 27, No 9(9-10). – P. 1708-1714.
8. Lan Z. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier / Z. Lan, W. Yang // Nanomedicine-UK. – 2012. – Vol. 7, No 4. – P. 579-96.
9. Pekkanen A. Nanoparticle enhanced optical imaging and phototherapy of cancer / A. Pekkanen, M. DeWitt, M. Rylander // Biomed Nanotechnol. – 2014. – Vol. 10, No 9. – P. 1677-1712.
10. Pizent A. Reproductive toxicity of metals in men / A. Pizent, B. Tariba, T. Živković // Arh Hig Rada Toksikol. – 2012. Vol.63. – P. 35-46.
11. Ray P. Nanogold-based sensing of environmental toxins: excitement and challenges / P. Ray, Yu. H, P. Fu // J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. – 2011. – Vol. 29, No 1. – P. 52-89. doi: 10.1080/10590501.2011.551315.
12. Subcellular localization of gold in suprarenal testicle and thyroid glands after injection of alloxysine in rats / L. Manoubi, M. Jaafoura, A. Skhiri-Zhioura // Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). – 1994. – Vol.40, No 4. – P. 483-487.
13. Surface-engineered gold nanorods: promising DNA vaccine adjuvant for HIV-1 treatment / L. Xu, Y. Liu, Z. Chen [et al.] // Nano Lett. – 2012. – Vol. 12, No 4. – P. 2003-2012. doi: 10.1021/nl300027p.
14. The biological activity of auranofin: implications for novel treatment of diseases / J. Madeira, D. Gibson, W. Kean [et al.] // Inflammopharmacology. – 2012. – Vol.20, No 6. – P. 297-306.

References

1. Balasubramanian S, Jittiwat J, Manikandan J, Ong C-N, Yu L, Ong W-Y. Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. Biomaterials 2010;31:2034–42.
2. Bhattacharyya K, Goldschmidt B, Hannink M, Alexander S, Jurkevich A, Viator J. Gold Nanoparticle-Mediated Detection of Circulating Cancer Cells. Clin Lab Med 2012;32:89–101.
3. Biswas NM, Chattopadhyay A, Sarkar M. Effects of gold on testicular steroidogenic and gametogenic functions in immature male albino rats. Life Sci 2004;76:629–36.
4. Matvienko MG, Pustovalov AS, Buzynska NO, Dzerzhinsky ME. Morphofunctional changes in 24-month rat testes under kisspeptin influence against blockade and activation of alpha-adrenergic receptors and melatonin administration. BMIR, 2012;95(2):170-3. Ukrainian.
5. Eghtedari M, Liopo AV, Copland JA, Oraevsky AA, Motamedi M. Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells. Nano Lett. 2009 Jan;9(1):287-91.
6. Lan Z, Yang W-X. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. Nanomedicine-Uk 2012;7:579–96.
7. Li W, Wang F, Liu Z, Wang Y, Wang J, Sun F. Gold Nanoparticles Elevate Plasma Testosterone Levels in Male Mice without Affecting Fertility. Small 2013;9:1708–14.
8. Madeira JM, Gibson DL, Kean WF, Klegeris A. The biological activity of auranofin: implications for novel treatment of diseases. Inflammopharmacology. 2012 Dec;20(6):297-306.
9. Manoubi L, Jaafoura MH, Skhiri-Zhioura A, el Hili A, Berry JP, Galle P. Subcellular localization of gold in suprarenal testicle and thyroid glands after injection of alloxysine in rats. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 1994 Jun;40(4):483-7.
10. Matvienko MG, Pustovalov AS, Dzerzhinsky ME. Testicular activity of young, mature and old rats after administration of prazosin and meztaton during blockade and activation of kisspeptinergic system. Problems of ecological and medical genetics and clinical immunology. 2012; 6(114): 66–78. Ukrainian.
11. Pekkanen AM, DeWitt MR, Rylander MN. Nanoparticle enhanced optical imaging and phototherapy of cancer. J Biomed Nanotechnol. 2014 Sep;10(9):1677-712.
12. Pizent A, Tariba B, Živković T. Reproductive Toxicity of Metals in Men. Archives Industrial Hyg Toxicol 2012;63:35–46.
13. Ray PC, Yu H, Fu PP. Nanogold-based sensing of environmental toxins: excitement and challenges. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2011;29(1):52-89. doi: 10.1080/10590501.2011.551315.
14. Xu L, Liu Y, Chen Z, Li W, Liu Y, Wang L, et al. Surface-engineered gold nanorods: promising DNA vaccine adjuvant for HIV-1 treatment. Nano Lett. 2012 Apr 11;12(4):2003-12. doi: 10.1021/nl300027p.

Надійшла до редколегії 29.02.16

В. Калиновский, асп., А. Пустовалов, канд. биол. наук, М. Держинский, д-р биол. наук
 Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
 Г. Гродзюк, канд. хим. наук, Н. Андришина, канд. хим. наук
 ООО "Наномедтех", Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕМЕННИКОВ НЕПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС

Исследовали влияние золота в форме коллоида и соли на функционирование семенников половозрелых крыс. Установлено, что ионы золота стимулируют пролиферативные процессы в сперматогенном эпителии, а также повышают функциональную активность интерстициальных клеток. Наночастицы золота, напротив, подавляли эндокринную функцию семенника, а также тормозили половое созревание. Таким образом, не смотря на стимулирующий характер соли золота, при переходе к наноразмерному классу этот металл приобретает токсические свойства.

Ключевые слова: Наночастицы, золото, семенник.

V. Kalynovskyi, PhD stud., A. Pustovalov, PhD, M. Dzerzhynsky, DSc
 Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
 G. Grodzyuk, PhD, N. Andriushina, PhD
 Nanomedtech-LLC, Kyiv, Ukraine

TESTICULAR MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF IMMATURE RATS UNDER THE EFFECT OF GOLD NANOPARTICLES AND IONS

Effect of ionic and colloidal gold on the testicular function of immature rats was investigated. It was shown that gold ions promote proliferative processes in the spermatogenic epithelium, and also increase interstitial cells' functional activity. At the same time, gold nanoparticles downregulated testicular endocrine function and slowed down puberty. To sum up, despite of the stimulatory nature of gold, transforming to nanoscale is accompanied by the obtaining of toxic properties.

Key words: Nanoparticles, gold, testis.