

БІОЛОГІЧНИЙ ВПЛИВ АЛМАЗНИХ НАНОЧАСТОЧОК ТА ТЕХНІЧНОГО ВУГІЛЛЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ КУРЯЧИХ ЕМБРІОНІВ

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

(м. Київ)

Дане дослідження відповідає пріоритетам Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали» на 2010-2014 роки, а також узгоджене з НДР кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця «Органи нервової, імунної та сечостатевої систем в умовах експериментального пошкодження», № держ. реєстрації 0112U001413.

Вступ. Дослідження у галузі нанорозмірних матеріалів демонструють значні переваги їх застосування у багатьох сферах медицини і промисловості. Одним з перспективних щодо діагностики і лікування матеріалів є алмазні наночасточки (АНЧ). Це пов'язано з їхніми унікальними характеристиками – біосумісністю, низькою хімічною реактивністю, оптичною прозорістю, надзвичайною міцністю тощо [3, 8, 12]. Пропонують застосування АНЧ в якості біосенсорів, переносників ліків, засобів візуалізації певних структур чи іммобілізації білків тощо [2, 3, 5, 7, 10, 11]. Розуміння базових принципів і особливостей впливу цих структур на живі організми, тропності до певних структур та органів є абсолютно необхідними для їх подальшого медичного і біологічного застосування. Тим не менше, наукових досліджень на цю тему в рази менше ніж тих, що описують все нові і нові потенційні сфери застосування АНЧ.

Більшість досліджень патологічних ефектів технічного вугілля (сажі) стосується потенційних ризиків для здоров'я при згоранні дизельного палива та фабричних емісій, де окрім нього міститься велика кількість інших речовин. До того ж, практично невисвітленим на сьогоднішній день [4] лишилось питання впливів сажі на різні системи організму, бо основну увагу дослідники зосереджують на легенях та шкірі.

На жаль, значна частина авторів, що заперечують канцерогенну чи будь-яку іншу патогенну дію сажі на живі організми, спирається на фрагментарне сприйняття її властивостей [6, 9]. Автори вважають, що сажа майже повністю складається з карбону, вона ніяким чином не включається в метаболізм і після інгаляції з часом просто виводиться з

організму за допомогою мукоциліарного транспорту. Вочевидь така інтерпретація біологічних ефектів сажі не зовсім коректна, що ми і спробуємо довести результатами цього дослідження.

Метою роботи було визначення впливу технічного вугілля (сажі) та АНЧ на печінку зародка з оцінкою спроможності цих матеріалів щодо тератогенних ефектів впродовж розвитку курячого ембріона.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктами дослідження були курячі ембріони породи Хайлайн білий (бройлери). Використана біологічна модель розроблена за методикою В. П. Терещенко, патент України № 49464. Курячий ембріон перебуває під потужним захистом від екзогенних впливів, тож є дуже зручним для вивчення різноманітних потенційно шкідливих речовин (медикаментів, пестицидів тощо) [1]. В експерименті було задіяно 114 яєць, розділених на 3 групи: інтактну (53 яйця) та дві експериментальні із введенням алмазних наночасточок (34 яйця) та технічного вугілля (27 яєць).

Разова підтримуюча доза активованого вугілля для дорослої людини вагою 70 кг складає 1,0 г. З урахуванням середньої ваги жовтка яйця (22 г) ми вираховували дозу для введення у жовтковий мішок зародка: $22 \times 1 : 70 \ 000 = 0,31$ мг. Оскільки вводити дані матеріали в організм в сухому вигляді неможливо, необхідно було підібрати розчинник. Ми зупинили свій вибір на Реополіглюкіні-Новофарм (Декстрані 40) оскільки за своїми властивостями і хімічним складом він наближений до рідин, котрі містяться в живих організмах. Тож, доза досліджуваних матеріалів складала 0,31 мг у 0,2 мл декстрану на одне яйце. Стерилізація матеріалу здійснювалась за $t = 120^\circ\text{C}$ впродовж 60 хвилин.

Введення матеріалу проводилось на 3 добу інкубації у жовтковий мішок, що обумовлено строками розвитку кровоносної системи зародків. Забір матеріалу для проводили на 14 і 20 добу інкубації. Ми акцентували увагу на печінці, оскільки саме цей орган забезпечує детоксикацію різноманітних шкідливих речовин.

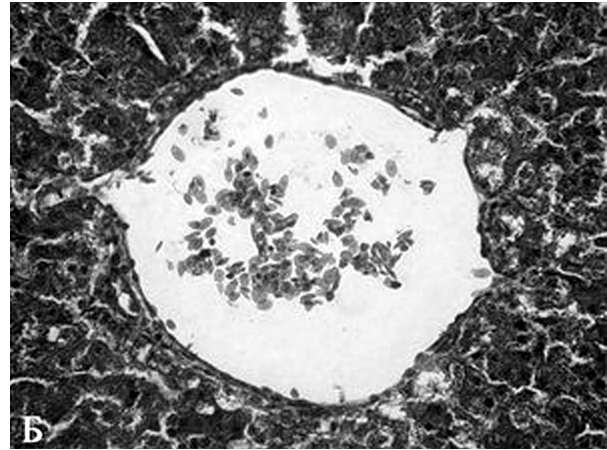
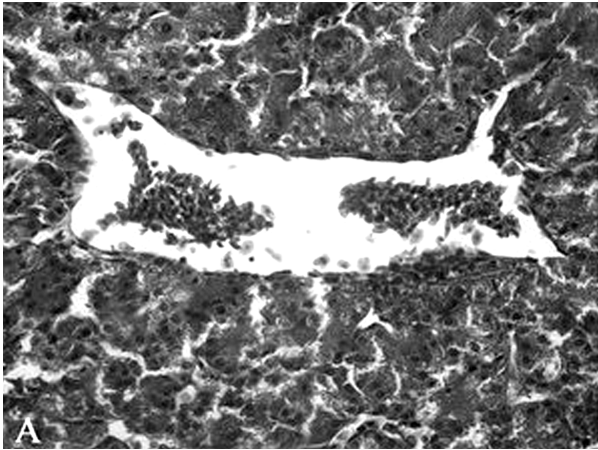


Рис. 1. Мікрофотографія зрізу печінки курячого ембріона 14-денного строку інкубації з групи із введеною сажею. Агрегація еритроцитів у судинах (А) та їх гемоліз (Б). Забарвлення гематоксиліном і еозином, об. 40х, ок. 10х.

Результати досліджень та їх обговорення.

Дослідження печінки в експериментальних групах показало локальні порушення балкової структури та нечіткі межі клітин біля центральних вен.

У групі, зародкам з якої вводили технічне вугілля, клітини мали розмиті межі, вони набрякли, а трабекул практично не видно. Базальна частина деяких гепатоцитів з локальними ушкодженнями. Розширення просторів Діссе вказує на набряк, в них накопичувався фільтрат, який не поглинули клітини печінки. В гепатоцитах були присутні ознаки білкової дистрофії, а навколо вен спостерігалась жирова дистрофія. Імовірно, осередкову локалізацію ліпідів саме навколо вен стимульовано гіпоксією. В судинах значні скупчення агрегованих еритроцитів (рис. 1). Синусоїди заповнені плазмою і клітинами крові, спостерігалось відмежування формених елементів від плазми. Еритроцити піддались гемолізу – клітини набухли, їхні ядра погано профарбовувались, були присутні фрагменти ушкоджених еритроцитів (рис. 1). Це дозволяє припустити дію технічного вугілля на кровоносну систему. Жовчні капіляри ознак застоїв жовчі не мали.

У експериментальній групі з введеними АНЧ балочна структура паренхіми майже не порушена. Лише місцями у зв'язку з незначним набряком строми балки відділені одна від одної. Білкова дистрофія виражена слабше, ніж у групі з технічним вугіллям, проявляється осередково. Межі клітин розмиті, цитоплазма зерниста, зі значними просвітами. Жирова дистрофія практично не зустрічається. Є велика кількість дрібних протоків, забитих жовчю (рис. 2). Загалом спостерігались ознаки застою жовчі та імбібції нею прилеглих тканин. Імовірно, АНЧ виводяться з печінки з жовчю.

У підсумку варто відзначити, що за даними гістологічних досліджень як технічне вугілля, так і алмазні наночасточки мають очевидний альтеруючий вплив на органи детоксикації і виділення зародка. Вони спричинюють набряки, дистрофії, утворення кальцинатів в нирках і застій жовчі в печінці. Сажа також

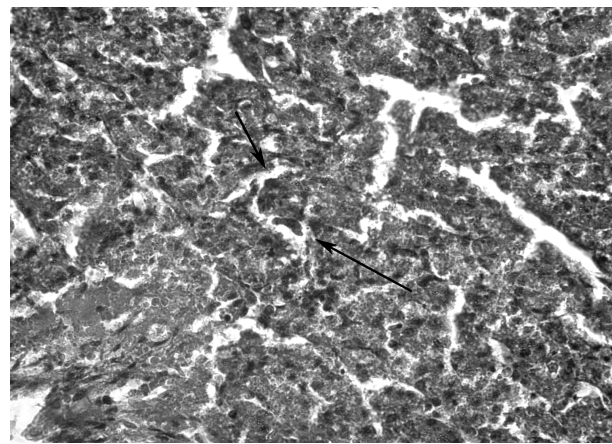


Рис. 2. Мікрофотографія зрізу печінки курячого ембріона 20-денного строку інкубації з групи із введеними АНЧ з ознаками застою жовчі (стрілки). Забарвлення гематоксиліном і еозином, об. 40х, ок. 10х.

має певний вплив на кровоносну систему, оскільки спричинила гемоліз еритроцитів.

Висновки.

1. За даними світлової мікроскопії встановлено здатність технічного вугілля (сажі) та алмазних наночасточок проникати крізь клітинні і судинні мембрани та згодом мігрувати в живому організмі.

2. За даними комплексних досліджень встановлено, що технічне вугілля і алмазні наночасточки чинять альтеруючий вплив на органи детоксикації зародка, спричинюючи дистрофічні зміни паренхіматозних клітин.

3. Відмінною ознакою тератогенного впливу АНЧ на курячі ембріони є застій жовчі та імбібція нею прилеглих тканин у печінці.

4. Відмінними ознаками тератогенного впливу технічного вугілля на курячі ембріони є дистрофічні зміни в печінці.

5. Виявлені нами патологічні процеси в тканинах курячих ембріонів, які зазнали дії технічного вугілля

та алмазних наночасточок, засвідчують можливість їхнього тератогенного впливу на живі організми.

Перспективи подальших розробок у даному напрямку. За результатами нашого дослідження доцільним є подальше вивчення тератогенних ефектів АНЧ, технічного вугілля та інших матеріалів,

що містять нанорозмірні складові, на різні структури організму, в першу чергу на стан нирок, як органу виведення. Для глибшого розуміння механізмів взаємодії наночасточок зі структурами живого організму необхідне залучення гістохімічних та електронно-мікроскопічних методик.

Література

1. Кузнецов А. Ф. Справочник по ветеринарной медицине / А. Ф. Кузнецов. – СПб. «Лань», 2004. – 912 с.
2. Barnard A. Diamond standard in diagnostics: nanodiamond biolabels make their mark / A. S. Barnard. // *Analyst*. – 2009. – Vol. 134, №9. – С. 1751 – 1764.
3. Biodistribution and fate of nanodiamonds in vivo / [Y. Yuan, Y. Chen, L. Jia-Hui et al.] // *Diamond and related materials*. – 2009. – Vol. 18, № 1. – С. 95 – 100.
4. Case-control Study of Circulatory, Malignant and Respiratory Morbidity in Carbon Black Workers in the USA / J. Robertson, T. Ingalls [et al.] // *American Industrial Hygiene Association Journal*. – 1989. – Vol. 50, № 10. – С. 510 – 515.
5. Functionalized fluorescent nanodiamonds for biomedical applications / V. Vijayanthimala, H-C. Chang [et al.] // *Nanomedicine London England*. – 2009. – Vol. 4, № 1. – С. 47 – 55.
6. Ingalls T. Incidence of Cancer in the Carbon Black Industry / T. Ingalls // *Archives of industrial Hygiene and Occupational Medicine*. – 1950. – Vol. 1. – С. 662 – 676.
7. Nanodiamond-insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles / R. A. Shimkunas, E. Robinson, R. Lam [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30, № 29. – С. 5720 – 5728.
8. Nanometer-Sized Diamond Particle as a Probe for Biolabeling / [J. -I. Chao, E. Perevedentseva, P. -H. Chung et al.] // *Biophys J*. – 2007. – Vol. 93, № 6. – С. 2199–2208.
9. Periodic Search for Cancer in the Carbon Black Industry / T. Ingalls, R. Risques-Iribarren [et al.] // *Archives of Environmental Health*. – 1961. – Vol. 2. – С. 429 – 433.
10. Preparation and characterization of green fluorescent nanodiamonds for biological applications / [T. -L. Wee, Y. -W. Mau, C. -Y. Fang et al.] // *Diamond and Related Materials*. – 2009. – Vol. 18, № 2-3. – С. 567-573.
11. Polymer-functionalized nanodiamond platforms as vehicles for gene delivery / [X. Q. Zhang, M. Chen, R. Lam et al.] // *ACS Nano*. – 2009. – Vol. 22, № 3. – С. 2609 – 2616.
12. Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice / [Y. Yuan, W. Xiang, J. Guang et al.] // *Diamond and Related Materials*. – 2010. – С. 291–299.

УДК 57. 017. 642:636. 52/. 58:546. 26

БИОЛОГІЧНИЙ ВПЛИВ АЛМАЗНИХ НАНОЧАСТОЧОК ТА ТЕХНІЧНОГО ВУГІЛЛЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ КУРЯЧИХ ЕМБРІОНІВ

Лавриненко В. Є.

Резюме. Мікроскопічними методами проаналізовано біологічні ефекти технічного вугілля (сажі) та алмазних наночасточок (АНЧ), участь печінки ембріонів у їх знешкодженні. У експериментальній роботі в жовтковий мішок зародків вводили суспензії сажі та АНЧ та проводили забір тканин на чотирнадцяту і двадцяту добу інкубації.

За даними мікроскопічних досліджень встановлено, що як сажа, так і АНЧ мають очевидний альтеруючий вплив на тканини печінки зародка. Вони спричиняють набряки, дистрофії, застої жовчі в печінці.

Ключові слова: алмазні наночасточки, технічне вугілля, токсичний ефект.

УДК 57. 017. 642:636. 52/. 58:546. 26

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ АЛМАЗНЫХ НАНОЧАСТИЧЕК И ТЕХНИЧЕСКОГО УГЛЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

Лавриненко В. Е.

Резюме. Микроскопическими методами проанализированы биологические эффекты технического угля (сажи) и алмазных наночастичек (АНЧ), участие печени эмбрионов в их обезвреживании. В экспериментальной работе в желточный мешок зародышей вводили суспензии сажи и АНЧ и проводили забор тканей на четырнадцатые и двадцатые сутки инкубации.

По данным микроскопических исследований установлено, что как сажа, так и АНЧ имеют очевидное альтерующее влияние на ткани печени зародыша. Они вызывают отеки, дистрофии, застой желчи в печени.

Ключевые слова: алмазные наночастицы, технический уголь, токсический эффект.

UDC 57.017.642:636.52/.58:546.26

Biological Effect of Nanodiamonds and Soot on Structural and Functional Conditions of Chicken Embryo Liver

Lavrinenko V. E.

Abstract. In our research we used chicken embryos to test the biological effects of soot and nanodiamonds on liver of the embryo.

We used chicken embryos (Tereschenko V. P. The method of biological impacts evaluation of substances and materials. – Ukrainian patent for useful model № 49464) on account of advantages of these objects: a) minimization of the influence of exogenous factors on the course of the experiment (chicken embryo is developing in the environment which is almost completely isolated from the external influences); b) the possibility to observe the physiological and pathological processes in dynamics; c) the study of different tissues; d) organizational and economic benefits.

We divided embryos in three groups – one intact and two experimental groups with soot and nanodiamonds. The eggs from all three groups were incubated in absolutely identical conditions (temperature, humidity etc.). The researched materials were introduced to the yolk sac of the embryo on the third day of incubation. This date was chosen because of the terms of embryo's circulatory system formation. The material was injected in the yolk sac because this provisional organ is a nutrient source of the embryo and this helps to avoid damage to the tissues of the organism while getting guarantee of penetration of the material into it.

The suspension was prepared on basis of biocompatible dextran (Rheopolyglucinum).

We injected 0, 2 ml of suspension pro one yolk.

The liver of the embryos was taken on the fourteenth and twentieth day. The organs were fixed in formaline, the slices obtained by microtome were stained with eosin and haematoxylin.

Microscopic methods were used to analyse biological effects of soot and nanodiamonds, the role of embryo's liver in their detoxication.

According to the microscopic research both soot and nanodiamonds were shown to have alteration effect on embryo's liver. They cause edema, dystrophy, biliary engorgement.

The teratogenic effect of nanodiamonds in liver was distinctive – the particles caused accumulation of bile in the tracts and imbibitions of tissues around it with bile. We suppose that nanodiamonds might be transported with bile.

Speaking about characteristic features of the soot biological effects we should mention that it causes dystrophy in liver and pathology in vessels. We observed aggregation of erythrocytes and their lysis. This data allows us to speak about harmful effects of soot on blood.

Both soot and nanodiamonds proved to have negative effects on liver of the embryo and be cytotoxic.

Keywords: nanodiamonds, soot, toxicity.

Рецензент – проф. Кочина М. Л.

Стаття надійшла 27. 01. 2015 р.