

## ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НАНОМЕТАЛІВ НА СТАН РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

**В. Ф. Шаторна, В. І. Гарець, О. О. Савенкова, І. І. Колосова**

*Кафедра медичної біології, фармакогнозії та ботаніки (зав. – проф., д. мед. н. В. І. Гарець), Державний заклад Дніпропетровська медична академія. 49600, Україна, Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9. E-mail: verashatornaya@yandex.ru*

### THE INFLUENCE OF HEAVY METALS AND NANOMETALS TO THE CONDITION OF REPRODUCTIVE FUNCTION IN EXPERIMENT

**V. F. Shatorna, V. I. Garets, O. O. Savenkova, I. I. Kolosova**

#### SUMMARY

The aim of the research was to determine the effect of lead acetate and nanometals on the reproductive system and the process of embryogenesis of experimental animals. In experimental models using citrate solutions of silver, gold, obtained by akvananotehnolohiyeyu and lead acetate solution. Experimental work performed on rats, Wistar male rats. Experimental results showed that the combined administration of low doses of lead and lead + nanosilver+ nanogold growing number of corpora lutea of pregnancy, number of live fetuses, due to the decrease in general and preimplantation embryonic mortality compared with the group with lead intoxication is almost the same weight of embryos. The above gives grounds to assert that taking drugs of nanogold and nanosilver on a black background intoxication prevents negative impact on the latter processes of embryonic development of the fetus in the experimental conditions and shows their bioantagonism.

### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И НАНОМЕТАЛЛОВ НА СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**В. Ф. Шаторная, В. И. Гарец, Е. А. Савенкова, И. И. Колосова**

#### РЕЗЮМЕ

Целью исследования было определение влияния ацетата свинца и нанометаллов на репродуктивную систему и ход эмбриогенеза подопытных животных. В экспериментальных моделях использовали растворы цитрата серебра, золота, полученных по аквананотехнологии и раствор ацетата свинца. Экспериментальная часть работы выполнена на крысах-самках линии Вистар. Результаты эксперимента показали, что при комбинированном введении низких доз свинца + наносеребро и свинца + нанозолото наблюдается увеличение количества желтых тел беременности, количества живых плодов по сравнению с группой со свинцовой интоксикацией при практически одинаковой массе плодов. Исследования показали, что прием препаратов нанозолота и наносеребра на фоне интоксикации свинцом предупреждает негативное влияние последнего на процессы эмбрионального развития в экспериментальных условиях и свидетельствует об их биоантагонизме.

**Ключові слова: важкі метали, свинець, репродуктивна система.**

При сучасному стані екологічних проблем, коли безліч хімічних, фізичних та фармакологічних факторів впливає на організм людини, що живе в промислових зонах, актуальним і своєчасним є дослідження впливу мікроелементів певних металів та їх наночастин на здоров'я людини взагалі та особливо репродуктивну функцію і ембріогенез. Для промислово розвинених областей України проблема забруднення важкими металами особливо актуальна. Загальновідомо, що пріоритетним токсикантом є свинець та його сполуки. Також в сьогоденні неможливо не приділяти увагу новим технологіям, що розвиваються дуже стрімко. В усіх галузях господарства і в медицині все більше місця займають нанотехнології [1, 2, 5, 6].

Феномен нанорозмірного парадоксу властивостей структур з переходом від мікро- до нанорозмірів детально ще не вивчений, але вже знайшов практичне застосування: в техніці та медико-біологічних галузях, у сільському господарстві. Серед усього різноманіття існуючих наночастин металів осо-

бливої уваги заслуговують наночастинки золота, заліза та срібла. Такий значний інтерес викликаний перспективністю використання наночастинок золота у технологіях конструювання вискоєфективних засобів діагностики та цільової терапії, зокрема онкологічних захворювань. Наносрібло вже досить давно використовується в медицині як антимікробний засіб, а нанозалізо розглядається сучасними дослідниками як альтернатива використанню препаратів заліза при анеміях. Інженерія наноматеріалів розвивається дуже стрімко і формує важливий клас нових матеріалів з особливими фізико-хімічними властивостями, що відрізняються від матеріалів тієї ж групи. Потенціал наноматеріалів швидко росте і постійно вивчається в різних галузях науки і техніки [3, 4, 11]. Унікальні властивості наноматеріалів роблять їх дуже привабливими для фармацевтичної промисловості, сільського господарства, технічної промисловості. Щодо впливу наночастинок металів на здоров'я людини, то сьогодні навести статистично достовірні факти виникнення хронічних хвороб неможливо. Найчастіше

токсична дія нанометалів вивчається в експерименті на тваринах або на культурах клітин. Результати досліджень показали, що наночастини можуть потрапляти в організм трьома основними шляхами: через дихальну систему, через шлунково-кишковий тракт та через шкіру, але деякі з наноматеріалів здатні проникати в незміненому вигляді через клітинні бар'єри, а також через гематоенцефалічний бар'єр в центральну нервову систему, циркулювати і накопичуватися в органах і тканинах, викликаючи патоморфологічні зміни внутрішніх органів. Вочевидь нанопатологія постає невідворотним явищем, супутнім розвитку нанотехнологій. Невивченим залишається вплив багатьох нанопродуктів на ДНК, клітину, ембріогенез, а іноді і на організм взагалі [12, 13].

Питання щодо безпечного використання вільних наночасток штучного походження в виробництві продуктів харчування остається не вирішеним і потребує подальшого як наукового, так і науково-правового обґрунтування.

Сучасними дослідниками в галузі сільського господарства та ветеринарії визначено, що найбільш перспективним шляхом одержання наномікронутрієнтів з гарантованою безпечністю та біотичністю є використання досягнень нанотехнології та біонеорганічної хімії для синтезу металоорганічних біокомплексів, що за своєю структурою та хімічною чистотою споріднені з тими, які синтезуються в живому організмі. На цей час теоретично і практично найбільш обґрунтованим є використання у виробництві продуктів харчування мікроелементів у формі карбоксилатів харчових кислот, насамперед у формі цитратів. В Україні групою фахівців-дослідників [8, 9] створено пріоритетний напрямок в нанотехнології, за допомогою якого отримані карбоксилати харчових кислот навіть таких низькорекційних благородних металів як золото і срібло (цитрати, сукцинати і аскорбати срібла і золота) та надчисті карбоксилати основних харчових кислот біогенних металів (цинку, магнію, марганцю, заліза, міді, кобальту, молібдену). На сьогоднішній день розробляється нове направлення в збагаченні харчових продуктів мікроелементами у вигляді карбоксилатів та цитратів біогенних металів, одержаних за допомогою аквананотехнології [6, 7, 10].

Інформація про безпечність та потенційний ризик наноматеріалів вкрай потрібна як для забезпечення здоров'я дорослої людини так і для організму, що розвивається. На жаль, досить активні дослідження з впливу наноматеріалів на організм майже не торкаються досліджень з виявлення ступеню ембріотоксичності і можливої тератогенності нанопродуктів. Не визначеними на сьогодні залишаються і питання можливого антагонізму чи синергізму нанорозмірних металів як мікроелементів.

Розробка методів експериментальних ембріологічних моделей завжди привертала увагу дослід-

ників, проте, дані результатів дослідження впливу важких металів або їх наноформ, які зустрічаються в літературі, у ряді випадків важко або неможливо співставити. Особливо це сьогодні стає актуальним у зв'язку з відсутністю даних про можливу ембріотоксичність та тератогенність наноструктур.

Мета дослідження: дослідити вплив ацетату свинцю та комбінації свинцю з нанозолотом, або наносріблом на репродуктивну систему та хід ембріогенезу дослідних тварин.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом дослідження було обрано в якості експериментальних тварин щурів. Перед початком експерименту всі тварини були оглянуті, зважені, враховувався їхній вік, рухова активність та стан шкіри. Під час спостереження лабораторні тварини утримувались в звичайних умовах віварію ДДМА. Годування, пиття, пересаджування тварин, зміна підстилки, миття кліток, прибирання приміщення проводилось з дотриманням стандартних умов, описаних в рекомендаціях. 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).

В експериментальних моделях використовували розчини цитрату срібла, золота, отриманих за аквананотехнологією. Цитрати біометалів безпечні, більше того, вони проявляють антиоксидантну і радіопротекторну дію, позитивно впливають на серцево – судинну і імунну системи організму, і тому ці сполуки найбільш повно відповідають вимогам, які пред'являють до інгредієнтів у складі продуктів харчування [4, 6, 8, 9]. Мінеральні речовини у вигляді цитратів дозволені до використання в харчових продуктах, в тому числі і для дитячого харчування [9].

Цитрати металів, отримані класичними методами не завжди відповідають вимогам чистоти, які ставляться до харчових інгредієнтів, а технології їх отримання трудомісткі і дорогі. Сучасними дослідниками розроблено методи синтезу цитратів натрію, калію, кальцію, магнію, цинка, заліза та інших металів [8, 9].

Показниками ембріотоксичності служать: перед-і постімплантаційна ембріональна смертність, морфологічні (анатомічні) вади розвитку, а так само загальна затримка розвитку плодів. Передімплантаційну смертність визначають за різницею між кількістю жовтих тіл в яєчниках і кількістю місць імплантації в матці; постімплантаційну смертність по різниці між кількістю місць імплантацій і кількістю живих плодів.

Експериментальна частина роботи виконана на 42 білих статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар вагою 180–200 грам у віці 95–110 днів. Щури – поліестрічні тварини з тривалістю естрального циклу

4–5 днів і спонтанним типом овуляції. В експериментальних моделях використовували розчини ацетату свинцю та цитрату цинку, срібла, золота, отриманих за аквананотехнологією [7].

Моделювання впливу розчинів нанометалів на організм самиці та на ембріогенез у щурів проводили за наступним планом.

Всі щури були розділені на 4 групи: 1 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05 мг/кг; 2 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05 мг/кг та розчин нанозолота у дозі 1,5 мкг/кг; 3 група – тварини, яким вводили розчин ацетату свинцю у дозі 0,05 мг/кг та розчин наносрібла у дозі 2 мкг/кг; 4 група – контрольна. Згідно загальноприйнятим інструкціям проведення експериментальних робіт, розчини металів та нанометалів вводили самицям через зонд один раз на добу, в один і той же час, з 1 по 19 день вагітності (на 20-й день вагітності проводили оперативний забій). Дослідних тварин виводили з експерименту способом передозування ефірного наркозу після вилучення матки з ембріонами. Щурят вилучали з матки, перевіряли на тест живі-загиблі, зважували, визначали стать, фотографували та фіксували у 10% розчині формаліну для подальшого гістологічного дослідження. Також досліджувалися органи самої самиці: серце, матка, яєчники, печінка, нирки, селезінка, стегнова кістка, головний мозок. Після фіксації вилучені органи самиці та ембріонів фіксували для подальшого мікроскопічного дослідження.

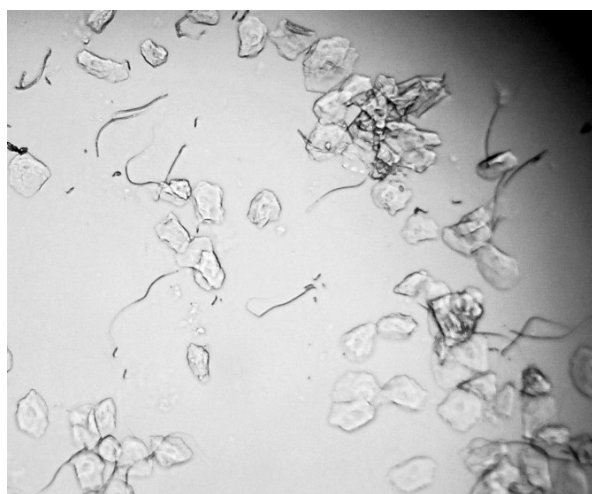
#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У самиць визначали стадії естрального циклу шляхом вивчення вагінального мазка. Першим днем вагітності вважали день виявлення сперматозоїдів в вагінальному мазку (рис. 1). У період статевого

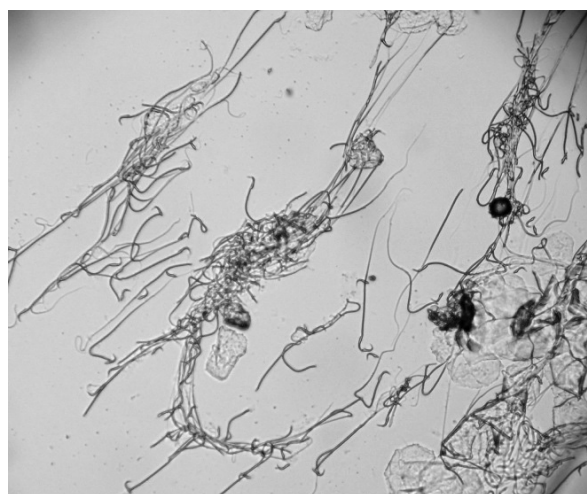
спокою в піхві переважають дрібні клітини – лейкоцити – стадія естрального циклу щура – дієструс. Передтічкова стадія характеризується різким зменшенням числа лейкоцитів, появою овальних клітин з ядрами і великих ороговілих естральних лусочок – без'ядерних клітин – стадія проєструс. При типовій тічці в полі зору мікроскопа виявляються тільки одні естральні лусочки різної форми, що нагадують розбиті крижинки – еструс (рис. 1а). Саме в цей період відбувається запліднення, яке і визначалось по наявності сперматозоїдів в піхві самиці. Після тічки у піхві з'являються лейкоцити і клітини з ядрами, відбувається зменшення естральних лусочок – метаєструс – запліднення в цей період не відбувається. Вагінальні мазки бралися в один і той самий час, а саме – з 9.00. до 11.00. ранку і при наявності в мазку сперматозоїдів самиць відсаджували в окремі клітини та починали відлік терміну вагітності (рис. 1б).

Під час операції приділяли особливу увагу органам репродукції та змінам, що виникають після впливу розчину важких металів та в комбінуванні з нанометалами. Для визначення фертильності самок щурів досліджували не тільки вагінальні мазки, але й будову самих репродуктивних органів: матки та яєчників як вагітних так і невагітних самок. Щури – це ссавці, що мають двороздільну матку (правий та лівий ріг), кожен ріг якої фіксується на брижі і наприкінці якого розташовано яєчник.

Окремо вивчалися форма та вагові показники гонад. Яєчники щурів мають округлу форму, горбисту поверхню, їх розміри та вага змінюються з віком та залежать від стадії естрального циклу у невагітних та під час вагітності. У статевозрілих самок фолікули видно неозброєним оком, за рахунок чого сам орган і має горбисту поверхню. В фазу метєструс з'являються жовті тіла, що мають більший діаметр



а



б

Рис. 1. Мікрофотографія незабарвленого нефіксованого вагінального мазка самиці щура та визначення першого дня вагітності: а – естральні клітини в мазках самиці; б – сперматозоїди та естральні клітини. 3б. 7х8

у порівнянні з зрілими фолікулами. Жовті тіла видні під оболонкою яєчника як білувато-жовті сферичні угруповання, що виступають над поверхнею органа.

Під час проведення операції вагітних самок, уважно оглядали внутрішні органи, матку, судини, яєчники, визначали кількість ембріонів в кожному відділі двороздільної матки і занесли дані до протоколу. В цей час визначали постімплантаційну смертність по різниці між кількістю місць імплантацій і кількістю живих плодів.

Ембріонів разом з плацентою обережно вилучали з матки не порушуючи пупкового канатика для подальших термінових прижиттєвих аналізів. Тест «живі-мертві» ембріонів проводили відразу після вилучення з матки: доторкання голкою до ембріона у живих викликає рефлекторні рухи. Мертві ембріони залишаються нерухомими. Результати тестування занеслися до протоколу і використовували для визначення наступних показників можливого токсичного впливу досліджуваних агентів.

Порівняння результатів ембріотропної дії низьких доз свинцю з показниками контрольної групи виявило його ембріотоксичність. Так, при практично однаковій кількості жовтих тіл вагітності в цих двох групах, спостерігається достовірне зниження кількості живих плодів на 17% –  $7,5 \pm 0,53$  проти  $9,0 \pm 0,4$  у контрольній групі відповідно.

В другій та третій експериментальних групах з використанням комбінації ацетату свинцю і нанометалів золота та срібла визначалося зменшення токсичної дії, а саме: збільшення кількості ембріонів, кількості жовтих тіл, що свідчить на користь позитивної дії останніх на репродуктивну систему та ембріогенез.

Аналіз загальних показників ембріонального розвитку в групі, що отримувала комбінацію ацетату свинцю та наносрібла виявив покращення показників репродуктивної системи та ембріонального розвитку порівняно з інтактною групою, що проявляється достовірним підвищенням кількості живих ембріонів на 1 самицю на 12,6% –  $10,13 \pm 0,4$  проти  $9,0 \pm 0,4$  ( $p < 0,05$ ), що обумовлено підвищенням кількості жовтих тіл вагітності майже на 10% –  $11,13 \pm 0,27$  проти  $12,88 \pm 1,06$  ( $p < 0,05$ ) при практично однакових показниках загальної та доімплантаційної смертності та відсутності постімплантаційної смертності. При цьому спостерігається тенденція ( $p = 0,056$ ) до зниження маси тіла плодів, яка становить, в середньому  $2,15 \pm 0,09$  г.

Отже, при комбінованому введенні препаратів свинцю та наносрібла, не зважаючи на наявність ембріотоксичних проявів при ізольованому введенні свинцю, спостерігається покращення показників ембріонального розвитку, що проявляється збільшенням кількості жовтих тіл вагітності, живих плодів на 1 самицю при практично однакових показниках загальної та доімплантаційної смертності та від-

сутності постімплантаційної смертності порівняно з інтактною групою тварин.

При порівнянні показників ембріонального розвитку з групою, що отримувала чистий препарат свинцю можна відзначити збільшення кількості живих плодів – на 35,13% ( $p < 0,001$ ), що обумовлено збільшенням на 32,7% ( $p < 0,05$ ) жовтих тіл вагітності, зменшенням у 2,7 рази ( $p < 0,001$ ) рівня загальної смертності за рахунок зменшення доімплантаційної смертності у 2,6 рази ( $p = 0,052$ ) та відсутності постімплантаційної смертності. Маса плодів у групі, що отримувала комбінацію свинцю та наносрібла, показниках маси плаценти та плодоплацентарного коефіцієнту практично не відрізняються від аналогічних показників у групі із ізольованою свинцевою інтоксикацією.

Аналогічні зміни спостерігались нами і в групі експерименту при комбінованому введенні препаратів свинцю та нанозолота, не зважаючи на наявність ембріотоксичних проявів при ізольованому введенні свинцю, визначалося покращення показників ембріонального розвитку, що проявляється суттєвим збільшенням кількості жовтих тіл вагітності, живих плодів на одну самицю при практично однакових показниках загальної та доімплантаційної смертності та відсутності постімплантаційної смертності порівняно з інтактною групою тварин, а також при практично однакових показниках маси тіла плодів.

При порівнянні показників ембріонального розвитку з групою, що отримувала чистий препарат свинцю можна відзначити суттєве збільшення кількості живих плодів – на 53,3% ( $p < 0,001$ ), що обумовлено декількома факторами – збільшенням на 30,4% ( $p < 0,05$ ) жовтих тіл вагітності, зменшенням у 2,3 рази ( $p < 0,001$ ) рівня загальної смертності за рахунок недостовірного зменшення доімплантаційної смертності у 2,1 рази та відсутності постімплантаційної смертності. Маса плодів у групі, що отримувала комбінацію свинцю та нанозолота дещо вища ніж у групі із ізольованою свинцевою інтоксикацією, проте вона недостовірна.

## ВИСНОВКИ

Таким чином, при комбінованому введенні низьких доз свинцю + наносрібла та свинцю + нанозолота спостерігається збільшення кількості жовтих тіл вагітності, кількості живих плодів, що обумовлено зниженням загальної та доімплантаційної ембріональної смертності порівняно з групою зі свинцевою інтоксикацією при практично однаковій масі плодів. Вищенаведене дає підставу стверджувати, що прийом препаратів нанозолота та наносрібла на фоні інтоксикації синцем попереджує негативний вплив останнього на репродуктивну систему та процеси ембріонального розвитку плодів в експериментальних умовах та свідчить про їх біоантагонізм.

*Робота виконана згідно НДР кафедри «Розвиток та морфофункціональний стан органів та тканин експериментальних тварин та людини в нормі, в онтогенезі, під впливом зовнішніх чинників», державний реєстраційний номер 0111U009598.*

## ЛІТЕРАТУРА

1. Верников В. М., Арианова Е. А., Гмошинский И. В., Хотимченко С. А., Тутельян В. А. Нанотехнологии в пищевых производствах: преспективы проблемы//Вопросы питания.-2009.-Т. 78, № 2.- С. 4–17.
2. Доклад для международного совета по управлению риском. Управление риском для применений нанотехнологий в продуктах питания и косметических средствах/А. М. Сердюк, М. П. Гулич, В. Г. Каплуненко и др.//Сб.: Проблемы окружающей среды и природных ресурсов. Обзорная информация. Москва,2009.- Выпуск 5.-2009.-с. 3–79.
3. Москаленко В. Ф. Нанотехнології, наномедицина, нанофармакологія: стан, перспективи наукових досліджень, впровадження в медичну практику/В. Ф. Москаленко, Л. Г. Розенфельд, Б. О. Мовчан, І. С. Чекман//І нац. конгр. «Человек и лекарство – Украина». – К., 2008. – С. 167–168.
4. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії/В. Б. Борисевич, В. Г. Каплуненко, Косінов М. В. та ін. (ред. проф. В. Б. Борисевич, проф. В. Г. Каплуненко). – К.: ВД «Авіцена», 2010. – 416 с
5. Нанонаука і нанотехнології: технічний, медичний та соціальний аспекти/[Б. Патон, В. Москаленко, І. Чекман, Б. Мовчан]//Вісник національної академії наук України. – 2009. – № 6. – С. 18–26.
6. Нанотехнології мікронутрієнтів: проблеми, перспективи та шляхи ліквідації дефіциту макро- та мікроелементів/[А. М. Сердюк, М. П. Гулич, В. Г. Каплуненко, М. В. Косінов]//Журнал Академії медичних наук України. – 2010. – Том 16, № 3. – С. 467–471.
7. Новинюк Л. В. Цитраты – безопасные нутриенты/Л. В. Новинюк. – Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 2009.- № 3 – с. 70–71.
8. Сердюк А. М., Гулич М. П., Каплуненко В. Г., Косинов Н. В. Перспективы использования достижений нанотехнологии для решения проблемы дефицита микроэлементов в питании населения/В Сб.. Матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання та організаційно-правові засади співробітництва України та КНР у сфері високих технологій» (Київ, 2 червня 2009 р.). – К. – 2009.-С. 135–140
9. Сердюк А. М., Гулич М. П., Каплуненко В. Г., Косінов М. В. Нанотехнології мікронутрієнтів: проблеми, перспективи та шляхи ліквідації дефіциту макро- та мікроелементів//Журнал АМН України.- 2010.-№ 1.- С.-107–114.
10. Цитрат цинку, отриманий за аквананотехнологією: хімічна та біологічна характеристика (оцінка хімічної чистоти та біологічної доступності)/М. П. Гулич [и др.]//Довкілля та здоров'я. – 2011. – № 2. – С. 44–49.
11. Якубчак О. М. Ефективність використання нанокompозиту порошку ферромагнетика в якості мікродобавки до корму для курчат-бройлерів/О. М. Якубчак, Л. В. Коваленко, Л. В. Бусол//Науковий Вісник НУБіП України. – 2010. – Вип. 151, ч. 2. – С. 366–370.
12. Hoshno A., Fujioka K., Oku T., and all. Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on their Surface Modification, Nano Letters.- 2004.- Vol. 4, № 11.- P. 2163–2169.
13. Oberdorster G., Maynard A., Donaldson K., and all. Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects From Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy, Particle, Fibre Toxicology.- 2005.- Vol. 2, № 8.- P.-235–246.