

## Биотестирование наночастиц меди и обоснование критериев токсикогенности в определении факторов развития плаценты\*

*Д.А. Боков, н.с., ГБОУ ОрГМУ; А.А. Слободсков, аспирант, С.В. Нотова, д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО Оренбургский ГУ; С.А. Мирошников, д.б.н., профессор, Всероссийский НИИМС*

Интенсивное развитие нанотоксикологии как отрасли инновационной медицины требует верификации всего перечня условий, определяющих величину параметров возможного воздействия наноматериалов на тканевые элементы различных органов. На сегодняшний день это одна из наиболее актуальных проблем в связи с развитием методов использования наноматериалов и необходимостью внедрения совершенных технологических принципов такого применения [1–3].

Эмбриологические приложения названной проблемы нуждаются в увеличении усилий, направленных на изучение свойств провизорных тканей на этапах их развития, и в том числе реализуемых в критические периоды [4, 5]. Сегодня совершенно отсутствуют сведения о закономерностях и механизмах плацентации в связи с влиянием тех или иных наноматериалов [6, 7].

**Цель исследования** – определить параметры развития хориональных структур плаценты в достигнутом диапазоне контроля компенсаторно-приспособительных условий сохранения инвазивно-трофического и регуляторного потенциала плаценты при поступлении в организм крысы наночастиц меди в эксперименте, показать критериально значимый уровень повышения степени плацентарной недостаточности.

**Материал и методы исследования.** Изучение влияния наночастиц меди осуществили в группах экспериментальных лабораторных крыс линии Вистар. Было сформировано три группы: I – контрольная (К), II и III – опытные ( $N_K=N_{II}=N_{III}=30$ ). Все мероприятия с животными соответствовали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (Страсбург, 1985).

Порошок из наночастиц меди получен в Институте энергетических проблем химической физики РАН (г. Москва). Частицы имеют форму сферы и размер 103 нм. Они покрыты оксидной плёнкой толщиной 6 нм. По данным рентгенофазового анализа, в составе частиц определяется 96% кристаллической меди и 4% – оксида меди. Взвесь порошка для инъекций экспериментальным животным готовили в ультразвуковой ванне.

Взвесь порошка вводили беременным самкам каждые три дня в течение всего гравидного периода начиная с первого дня (контроль наступления беременности по образованию вагинальной пробки). Причём животным II опытной гр. инъектировали вещество в концентрации 0,5 мг/кг, III опытной гр. – 1 мг/кг, а крысам I контрольной гр. вводили физиологический раствор [2].

Для гистологических исследований материал подвергли стандартной обработке. Серийные срезы плацент окрашивали гематоксилином Майера и эозином с последующей морфометрией структур и статистической обработкой данных.

Для измерения гистологических элементов использовали окулярную сетку Автандилова с количеством точек, равным 225, а также окуляр-микрометр.

Необходимый объём выборки гистологических элементов ( $n_\alpha$ ) формировали, используя формулу:

$$n_\alpha = \sum_{i=1}^N \frac{A_i \times a_i}{N}$$

где  $i$  – номер конкретного животного из данной группы,  $A$  – количество полей зрения, в которых учитывался параметр, – количество гистологических элементов, учтённых в конкретном поле или количество точек плотности метрической сетки в конкретном поле [8].

**Результаты исследования.** Оценка отдельных количественных параметров развития плаценты позволила верифицировать чувствительность всех процессов тканевой динамики хориональных структур к поступлению в организм наночастиц меди в каждой из опытных групп животных.

К 18-му дню беременности у крыс опытных групп происходило значимое ухудшение взаимоотношений организмов матери и плодов, что связано прежде всего с гипоплазией плаценты.

Критериальную констатацию данного условия снижения трофической функции плаценты можно продемонстрировать в связи со снижением массы плаценты (рис. 1). У животных (II и III) опытных групп наблюдалось последовательное отставание по данному показателю (как характеризующему динамику формирования плацентарных элементов) более чем на 20% по сравнению с особями контрольной гр. ( $n(K)=27$ ,  $n(II)=48$ ,  $n(III)=35$ ).

Обосновать гипоплазию плаценты позволяет значительный объём незрелого трофобласта в пределах лабиринтной зоны, что, очевидно, отражает

\* Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 14-36-00023)

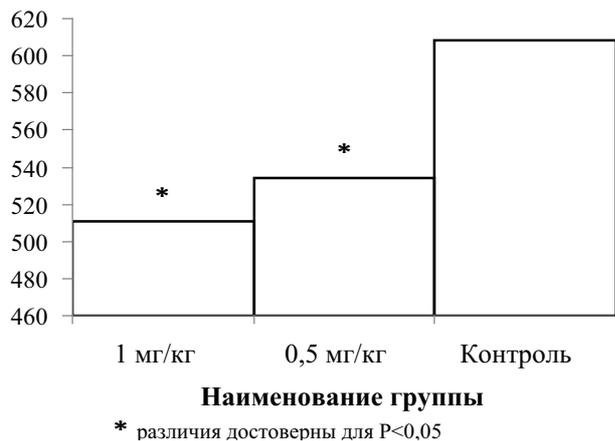


Рис. 1 – Масса плаценты, мг

нарушение процессов плацентации, детерминации тканевых элементов хориона, а также недостаточный инвазивный потенциал трофобласта.

В самом деле на основе гистологического анализа установлен факт усугубления ограниченных возможностей дифференцировки хориональных структур при увеличении концентрации вводимого наноструктурированного вещества, когда в фетальной части плаценты обнаруживаются многочисленные островки незрелого трофобласта. Последний представляет собой симпласт с гигантскими ядрами (наиболее раннюю форму развития), а также характеризуется выраженной базофилией цитоплазмы, иногда имеет признаки дистрофии и распада. При этом следует подчеркнуть, что незрелые элементы всегда присутствуют в активно функционирующей плаценте. Но при доведении концентрации вводимого вещества до 1 мг/кг происходит двукратное увеличение объёма недифференцированных структур хориона (рис. 2: n (K)=4500, n (II)=5850, n (III)=6750).

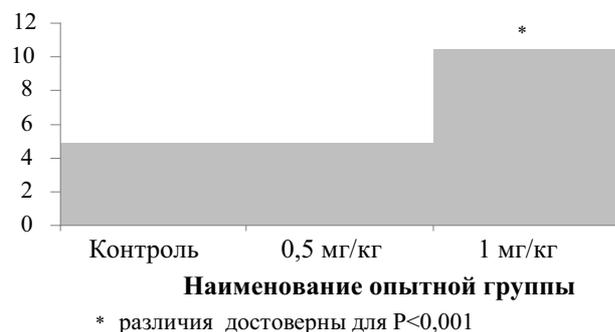


Рис. 2 – Относительный объём незрелого трофобласта, %

Всё вышеизложенное обуславливает постановку вопроса об активности и эффективности компенсаторных процессов в плаценте для адекватного роста плода и дифференцировки его структур в гисто-, органо- и системогенезе.

Формальным и надёжным критерием высоких адаптивных возможностей тканей как биологиче-

ских систем поддержания (сохранения) их значительного приспособительного потенциала является степень изменчивости структур, повышение уровня их гетерогенности.

Анализ статистических закономерностей изменения количественных параметров развития плаценты у самок сравниваемых групп позволил показать конкретные факторы изменения приспособительных возможностей тканевых элементов плаценты. В частности, интерес представляет поведение параметра относительного объёма фетальной части плаценты (рис. 3:  $n_{\alpha}(K)=n_{\alpha}(II)=n_{\alpha}(III)=6750$ ).

Накопление точек плотности метрической сетки Автандилова в выборках животных сравниваемых групп однозначно соответствует выводам о незавершённости морфогенетических процессов развития плаценты у самок опытных групп. На представленном графике (рис. 3) о гипоплазии свидетельствует достоверное снижение анализируемого параметра объёма фетальной части плаценты у крыс всех групп. Но дисперсионный анализ демонстрирует сложность реактивных процессов перестройки плаценты на этапах прогрессивного становления её несостоятельности. Так, уровень изменчивости в группе животных, которым инъецировали 0,5 мг/кг взвеси наночастиц, был достоверно выше по сравнению с группой контроля. Это может указывать на активность конкурирующих процессов повреждения и компенсации или регенерации. Данный феномен был подтверждён в связи с верификацией большого количества симпластических почек лабиринта, формирующихся из эпителия промежуточных дифференцированных ворсин. Кроме того, обнаруживались новообразующиеся терминальные ворсинки (балки), как выражение индуцированных в данной группе животных пластических процессов в плаценте.

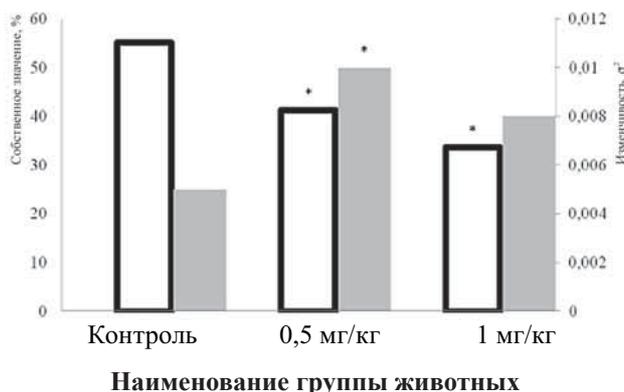


Рис. 3 – Относительный объём фетальной части плаценты

В группе животных, получавших вещество наночастиц меди с наибольшей концентрацией, уровень изменчивости вновь снижился и был недостоверно увеличен в сравнении с контрольной

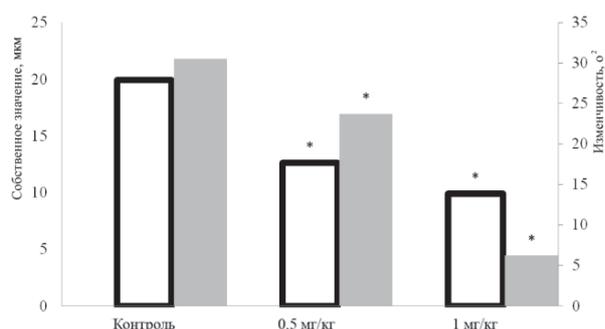
группой. Такое поведение параметра, вероятно, отражает истощение адаптивных возможностей и убедительно свидетельствует о нарастании деструктивно-дегенеративных процессов и соответствует этапу декомпенсации реактогенных свойств тканевых элементов хориона. Фактическим подтверждением охарактеризованных выше процессов является выразительная атрофия балок и резкое расширение лакун с материнской кровью.

Таким образом, показанный уровень изменчивости можно считать обоснованным критерием перестройки плаценты при введении в организм наночастиц меди.

Наиболее функционально значимым параметром является площадь поверхности хориона, на уровне которой осуществляется обмен веществ между организмами плода и матери. Здесь критерияльным условием эффективности трофических отношений будет степень развития балочного аппарата (количество в единице объёма, уровень анастомозирования, диаметр).

При измерении диаметра балок лабиринтной зоны было определено снижение данного параметра у животных опытных групп при высокой доле исключения совпадений вариантов в выборке (рис. 4:  $n_a(K)=50$ ,  $n_a(II)=54$ ,  $n_a(III)=50$ ).

Снижение диаметра балок при увеличении концентрации вводимого вещества наночастиц меди также соотносилось и с уменьшением уровня изменчивости от контрольной группы к III опытной группе.



Наименование группы животных

\* различия достоверны для  $P < 0,001$

Рис. 4 – Диаметр балок лабиринтной зоны плаценты

Самый высокий уровень изменчивости в контрольной группе – признак активности всей ширины диапазона параметра диаметра балок. Использование всей ширины возможного диапазона значений параметра, вероятно, характеризует предельную развитость классовой структуры балочной сети. При этом очевидно, что распределение диаметров по классам соответствует необходимой величине поверхности, когда некоторые классы наиболее мелких балок просто отсутствуют в опытных группах. При токсическом воздействии на

структуры хориона повреждение распространяется быстрее, чем пластические процессы новообразования балок, и опережает возможный период функциональной активности отдельных балок.

Следовательно, данные дисперсионного анализа развития балочной сети фетальной части плаценты позволяют обосновать возможность использования изменчивости диаметра балок для оценки токсикогенности наночастиц меди. При этом доказано, что наибольшую степень приспособленности к эффективному обмену между организмами матери и плода имеет плацента животных контрольной группы с высокими величинами дисперсии диаметра балок.

**Выводы.** Поступление в организм беременной крысы наночастиц меди обуславливает индикативное изменение всего комплекса количественных параметров, выражающих развитие плаценты: этапность, объём и направление дифференцировки её структур. Статистический анализ вскрывает специфичные для каждой опытной группы закономерности реализации реактивных тканевых процессов. При этом очевидно, что верификация прямого сдвига параметра на основе формирования собственного распределения вариантов (принадлежащих собственной выборке (для  $P < 5\%$ )), оказывается мало- или недостаточно информативным методом статистической интерпретации данных. Доказана необходимость использования дисперсионного анализа, на основе которого возможно критериальное обоснование обобщённых представлений о биологическом значении наблюдаемых феноменов и прежде всего об эффективности приспособительных процессов.

В целом на основе оценки количественных параметров развития плаценты показана токсикогенная роль порошка из наночастиц меди, поступление которого в организм во время беременности является причиной становления плацентарной недостаточности. Нарушение взаимоотношений организмов матери и плода имеет выражено патологический характер при увеличении концентрации вводимого вещества и исключает возможность компенсаторно-пластических процессов в связи с повреждением механизма плацентации и невозможностью полноценной дифференцировки структур хориона.

Полученные данные позволяют сформулировать рекомендации о невозможности использования данного вещества для биомедицинских манипуляций у животных в период гестации. Новые критерии предлагается использовать в токсикологических исследованиях.

### Литература

- Захидов С. Т. Влияние ультрамалых наночастиц золота на хроматин нативных спермиев мышей / С. Т. Захидов, В. М. Рудой, О. В. Дементьева, Н. М. Муджири, И. В. Макарова, И. А. Зеленина, Л. Е. Андреева, Т. Л. Маршак // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2015. № 6. С. 565–572.
- Полякова В. С. Морфофункциональная характеристика щитовидной железы при введении наночастиц меди / В. С. По-

- лякова, Е. А. Сизова, С. А. Мирошников, С. В. Нотова, С. М. Завалеева // Морфология. 2015. Т. 148. № 6. С. 54–58.
3. Топурия Г. М. Экология и воспроизводство животных. Оренбург, 2009. 96 с.
  4. Боков Д. А. Эмбриотоксическое значение низких доз формальдегида: структурные факторы, закономерности гестации, исходы беременности / Д. А. Боков, М. А. Сеньчукова, Е. И. Шурыгина, Л. В. Ковбык, А. К. Логинова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. Т. 16. № 5(2). С. 665–667.
  5. Боков Д. А. Экспериментальное моделирование токсикогенной патологии эмбриогенеза: экологические аспекты / Д. А. Боков, П. С. Неверова, М. П. Обидченко, М. А. Сеньчукова, Н. Н. Шевлюк // Вестник Оренбургского государственного университета. 2015. № 10. С. 203–207.
  6. Золотухина И. А. Функциональная морфология эпителия ворсин плаценты человека в разные сроки неосложнённой беременности: автореф. ... канд. биол. наук. М., 2014. 26 с.
  7. Сетко Н. П., Стадников А. А., Фатеева Т. А. Особенности биологического действия сернистых соединений на женский организм. М.: Медицина, 2004. 192 с.
  8. Милованов А. П., Брусиловский А. И. Стандартизация методов морфометрии плаценты человека // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1986. Т. ХСІ. № 8. С. 72–78.