

УДК: 57.017.642:636.52/.58:546.26

В. Лавриненко, старш. лаб., Ю. Чайковський, д-р мед. наук
Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Киев

ВПЛИВ ВУГЛЕЦЕВИХ МАТЕРІАЛІВ РІЗНОЇ ДИСПЕРСНОСТІ НА МАКРОСКОПІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЕМБРІОГЕНЕЗУ КУРКИ

Досліджено вплив вуглецевих матеріалів різної дисперсності на курячі зародки, одержані при інкубуванні яєць лінії Хай-Лайн білий. Розчин активованого вугілля, алмазних наночастинок, технічного вугілля та терморозширеного графіту на біосумісному декстрані вводили у жовтковий мішок зародків на 3 добу інкубації і проводили оцінку розмірів ембріонів та стану судин стінки їх жовткового мішка на 6, 14 і 20 добу інкубації. За однакових умов з експериментальними групами інкубували яйця з інтактною групою, які не зазнавали жодних сторонніх впливів. Було показано негативний вплив технічного вугілля на стан судин стінки жовткового мішка зародків, алмазних наночастинок та технічного вугілля на обидва макроскопічні показники ембріогенезу курки.

Ключові слова: ембріогенез курки, активоване вугілля, сажа, алмазні наночастинок, терморозширений графіт, судини стінки жовткового мішка.

Вступ. У зв'язку зі зростаючим у всьому світі інтересом до застосування нанорозмірних вуглецевих матеріалів у різних галузях людської діяльності, і в медицині зокрема, актуальними є дослідження їх впливу на живі організми на прикладі такого чутливого зразка, як курячий ембріон. На жаль, незважаючи на значну кількість дослідження токсичності наноматеріалів не стандартизовані, через що важко встановлювати зв'язок між отриманими результатами та будовою, розмірністю різних матеріалів, їхніми біологічними ефектами [1 – 5]. Загалом вважається, що активоване вугілля (АВ) не здатне проникати крізь тканини організму і абсолютно інтактне, тому з давніх часів використовується в медицині. Проте технологія приготування АВ, котра передбачає вплив високих температур, може супроводжуватись утворенням дрібних часточок з великою проникною здатністю, зокрема – нанорозмірних. Аналогічно є ситуація з терморозширеним графітом, що переважно використовується у промисловості і лише опосередковано – в медицині, (матриця для синтезу нанотрубок), адже для розширення просторів у кристалічній решітці природно-кристалічного графіту використовують хімічні сполуки і високу температуру.

Більшість досліджень патологічних ефектів технічного вугілля (сажі) стосується потенційних ризиків для здоров'я при згоранні дизельного палива та фабричних емісій, де міститься велика кількість інших речовин. До того ж, практично невисвітленим на сьогоднішній день лишилось питання впливу сажі на різні системи організму, бо основну увагу дослідники зосереджують на легенях та шкірі. Значна частина авторів, що заперечують канцерогенну чи будь-яку іншу патогенну дію сажі на живі організми, спирається на фрагментарне сприйняття її властивостей [6]: оскільки сажа майже повністю складається з карбону, вона ніяким чином не включається в метаболізм і після інгаляції з часом просто виводиться з організму за допомогою мукоцільярного транспорту. Все більшу увагу промисловості, пов'язаної з наноматеріалами, привертають розробки алмазних наночастинок. Вони наділені унікальними характеристиками – біосумісністю, низькою хімічною реактивністю, оптичною прозорістю, надзвичайною міцністю тощо [7]. Сучасні публікації все частіше описують різноманітні дивовижні властивості і шляхи їх застосування: в якості біосенсорів, переносників ліків, засобів візуалізації певних структур чи іммобілізації білків [8 – 10]. Розуміння базових принципів і особливостей впливу цих структур на живі організми, оцінка можливих ризиків їх використання, є абсолютно необхідними для їх подальшого медичного і біологічного застосування. Тим не менш, наукових досліджень на цю тему в рази менше ніж тих, що описують все нові і нові потенційні сфери застосування алмазних наночастинок.

Отже, застосування вуглецевих наноматеріалів у медицині на сьогоднішній день залежить від співвідношення переваг, пов'язаних з їх залученням до процесу лікування та ризиків, спряжених з їх використанням.

Матеріали і методи. Для дослідження дії вуглецевих матеріалів різної дисперсності на живий організм в якості об'єктів впливу використовувались ембріони курей породи Хайлайн білий (бройлери) (В.П. Терещенко, патент України №49464). В експерименті було задіяно 154 яйця розділені на 5 груп: одну інтактну (53 яйця) та чотири експериментальні. Зародкам з експериментальних груп вводили активоване вугілля (20 яєць), алмазні наночастинок (34 яйця), технічне вугілля (27 яєць) та терморозширений графіт (20 яєць). Нерівномірний розподіл яєць між експериментальними групами обумовлений різною кількістю незапліднених яєць в кожній з них.

Досліджувані матеріали вводили в жовтковий мішок ембріона, оскільки саме з нього організм отримує всі поживні речовини. Таким чином введений матеріал може потрапляти до організму зародка напряму за рахунок проникнення через оболонки чи після проковтування жовтка через шлунково-кишковий тракт. Для забезпечення потрапляння матеріалу саме в жовтковий мішок і запобігання пошкодження як самого зародка, так і його провізорних органів, яйця на певний час розміщували горизонтально, щоб зародковий диск розмістився на поверхні жовтка, і під фіксованим кутом вводили голку на визначену довжину. Для підтримання замкнутості внутрішнього середовища яйця отвір від введення матеріалу запліплювали воском. Доза досліджуваних матеріалів складала 0,31 мг на одне яйце.

Розрахунок дозування було здійснено на основі разової підтримуючої дози активованого вугілля 1,0 г при вазі людини 70 кг у перерахунок на вагу жовтка яйця (22 г):

$$22 \times 1:70 \text{ 000} = 0,31 \text{ мг}$$

Оскільки вводили дані матеріали в організм в сухому вигляді неможливо, необхідно було підібрати розчинник. Зазвичай з данною метою використовують біосумісні рідини, тобто ті, що за своїми властивостями і хімічним складом наближені до рідин, котрі містяться в живих організмах. Ми зупинили свій вибір на Реополіглюкіні-Новофарм (Декстрані 40). Досліджувані матеріали було введено в об'ємі 0,2 мл декстрану на один жовток. Кількість рідини, що вводилася є допустимою для введення у експериментах з курячими зародками. Стерилізація матеріалу здійснювалась за t° 120 $^{\circ}$ C впродовж 60 хвилин. Всі групи яєць інкубувались в абсолютно однакових умовах – в одному побутовому інкубаторі моделі Термія-60 за однакових вологості і температури (37,5 – 38,5 $^{\circ}$ C). Введення матеріалу проводилось на 3 добу інкубації, що обумовлено строками розвитку кровоносної системи зародків. Забій проводили на 6, 14 і 20 добу інкубації. Дані щодо розмірів зародків з експе-

риментальних груп порівнювались із аналогічними показниками (із врахуванням строку інкубації) інтактної групи. Таким чином визначалась відповідність отриманих макропараметрів курячих ембріонів експериментальних груп стандартним показникам. При заборі оцінювався також стан судинної сітки оболонки жовткового мішка ембріонів, відмічались її розвиток, гіперемія чи запустіння судин. При порівнянні показників ембріогенезу зародків з інтактної та експериментальних груп для оцінки вірогідності відмінностей між групами використовували критерій Стюдента при $p \leq 0,05$. Проводилось порівняння розмірів зародків та стану судин їх жовткового мішка за сумою даних з трьох строків інкубації (шоста, чотирнадцята та двадцята доба).

Результати та їх обговорення. При огляді зародків з групи із введеним активованим вугіллем на ранніх стадіях розвитку (шоста доба інкубації) макроскопічно ніяких патологічних процесів чи змін у самих зародках чи їх оболонках не спостерігалось. Зародки за стадією розвитку відповідали стандартам своєї доби інкубації або трохи випереджали її. У ембріонів спостерігались такі характерні ознаки відповідного строку інкубації як переважання розмірів середнього мозкового пухиря, що

піднімався над поверхнею голови та поява зачатку дзьоба. Розвиток провізорних органів також відповідав нормі – у зародків уже був сформований амніон, була розвинена кровоносна мережа жовткового мішка, що проглядалась до найменших судин і не містила крововиливів. Середовище в амніотичній порожнині не мало помутніти чи інших патологічних ознак. Пізніше, на середніх строках інкубації, можна було спостерігати подальші прояви розвитку ембріонів, такі як поява малюнку на шкірі і кігтів. Більшість ембріонів, що досягли 20 доби інкубації, мали крупні розміри і не мали проявів патологій.

При статистичному дослідженні макроскопічних показників розвитку ембріонів з групи із введеним активованим вугіллем, жоден з них достовірно не відрізнявся від показників інтактної групи. У інтактній групі кількість нормальних за розмірами зародків переважала всі інші варіанти, що цілком логічно, оскільки ні стимулюючого, ні сповільнюючого ріст впливів на неї не здійснювалось. Для групи з активованим вугіллем кількість крупних та стандартних для своєї доби інкубації зародків була однаковою (35%), а маленьких ембріонів було значно менше, що свідчить на користь позитивного впливу активованого вугілля на перебіг процесів ембріогенезу (рис. 1).

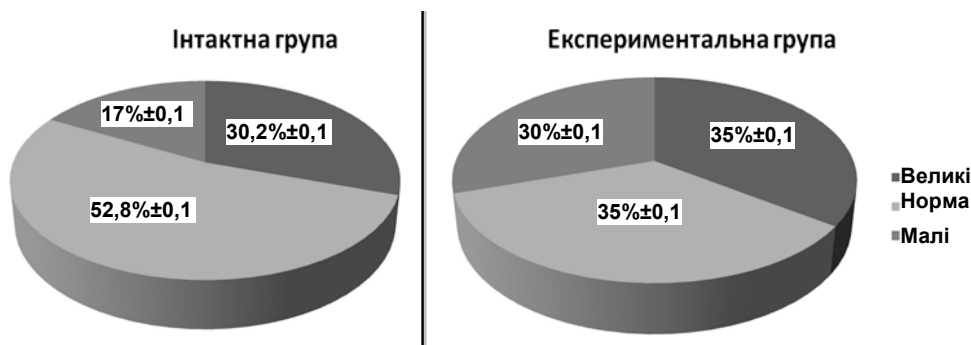


Рис. 1. Порівняльна характеристика стану зародків інтактної групи та експериментальної з введеним активованим вугіллем

Імовірно, вугілля, що тривалий час перебувало у замкнутій системі зародка в яйці, сорбувало на себе продукти обміну, утворення яких супроводжує процес ембріогенезу. Це сприяло активнішому перебігу обмінних і ростових процесів ембріона.

Лише незначна частка зародків з інтактної групи мала патологію кровоносних судин у оболонці (17% зародків з патологічно зміненими судинами). Відсоток патології при введенні активованого вугілля був дещо вищим (40%), проте достовірно не відрізнявся від інтактної групи. Дану тенденцію можна скоріше зв'язати з зовнішнім втручанням, ніж із безпосередньою руйнуючою дією активованого вугілля на судини.

При огляді зародків з групи із введеним технічним вугіллем затримок у розвитку виявлено не було. За розмірами та макроскопічними ознаками ембріони відповідали своїй стадії розвитку. Проте з ранніх стадій у даній групі спостерігались порушення стану судин оболонки ЖМ: запустіння та гіперемія. Це свідчить на користь негативного впливу технічного вугілля на судинну систему, адже саме судини стінки жовткового мішка першими стикаються із сажою, введеною в ньо-

го. Про відхилення у розвитку судин, спричинені введенням сажі, свідчать також дані щодо пізніших стадій інкубації. На 14 добу в судинах зародків спостерігалась гіперемія. Самим зародкам була притаманна затримка у розвитку: вони були меншими за норму. На пізніх стадіях інкубації частина зародків відставала у розвитку – спостерігалось не втягнення жовткового мішка у черевну порожнину, менші від норми розміри ембріонів. Дані статистичної обробки макроскопічних показників групи, якій вводили сажу, показали, що крупних розмірів досягли лише 11,1% зародків – достовірно менше, ніж у групі контролю (30,2%). Кількість ембріонів стандартних розмірів співрозмірна з інтактною групою (55,6% та 52,8% відповідно), маленьких дещо більше, ніж серед контролю (33,3% та 17% відповідно). Дані показники вказують на те, що сажа суттєво не впливає на темпи розвитку зародків.

Достовірна різниця між кількістю зародків із порушеною судинною оболонкою у групі із сажою та інтактній групі вказує на негативний вплив сажі на судини в цілому (рис. 2).

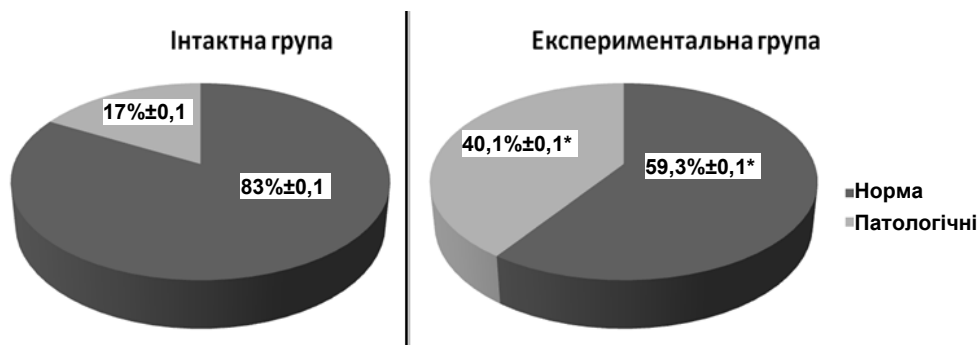


Рис. 2. Порівняльна характеристика стану судин оболонки зародків інтактної групи та експериментальної з введенням технічним вугіллям (* $p \leq 0,05$)

При огляді зародків з експериментальної групи із введеними алмазними наночасточками на ранніх стадіях ембріогенезу відсутнього впливу алмазних наночасточок на його перебіг не спостерігалось. Зародки мали ознаки і розміри, притаманні відповідним стадіям інкубації при нормальному ембріогенезі, судинна сітка жовткового мішка та провізорні органи загалом були не порушеними. На 14 добу у зародків спостерігались порушення в провізорних органах – амніон значно перевищував за розміром норму, в амніотичній порожнині накопичилось багато рідини. У судинах стінки жовткового мішка спостерігалось запусіння, що свідчить про порушення всмоктування і постачання поживних речовин жовтка до зародка. На користь цього свідчить і те, що дана група достовірно

відрізняється від інтактної за кількістю маленьких зародків. На 20 добу інкубації зміни у провізорних органах стали ще більш вираженими. Спостерігалась потовщення амніотичної оболонки, у судинах стінки жовткового мішка спостерігались запусіння і згорання крові. За даними статистичної обробки макроскопічних показників у групі із введеними алмазними наночасточками значно зросла частка дрібних зародків, що свідчить на користь негативного ефекту нанолмазів на темпи росту і розвитку курячого зародка (рис.3). На те саме вказує і наявність достовірної різниці показників ушкодження судин між контролем та експериментальною групою (17% проти 38,2% зародків зі зміненими судинами відповідно).

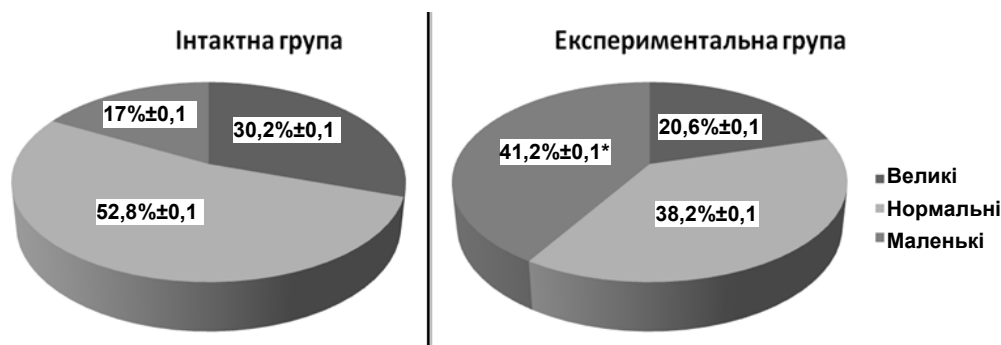


Рис. 3. Порівняльна характеристика стану зародків інтактної групи та експериментальної з введеними алмазними наночасточками (* $p \leq 0,05$)

Загалом для даної експериментальної групи характерне поступове погіршення стану зародків із проявами патології в провізорних органах та самому організмі ембріонів. Можна говорити про поступовий вплив алмазних наночасточок на розвиток зародків, що проявився у зменшенні їх розмірів та порушеннях роботи органів. Найяскравіше було виражено зміни у експериментальній групі із введеним терморозширеним графітом. Загалом цей матеріал мав різко негативний вплив на розміри зародків, а також стимулював ушкодження судин стінки жовткового мішка. Більшість зародків були дрібними, судини жовткового мішка у них мали ознаки патології. Очевидно, що негативний вплив терморозши-

реного графіту почав проявлятися ще з моменту введення, адже при заборі матеріалу на 6 добу, через три доби після введення, було виявлено мертві і вже частково лізовані зародки, запусілу судинну оболонку жовткового мішка. Наявність достовірної різниці як щодо розмірів зародків (крупних зародків не було взагалі, частка середніх склала 10%, а маленьких 90%), так і щодо стану судин стінки жовткового мішка є підтвердженням значного негативного впливу терморозширеного графіту на ембріогенез. Даний вплив почав проявлятися ще з моменту введення даного досліджуваного матеріалу (рис. 4).

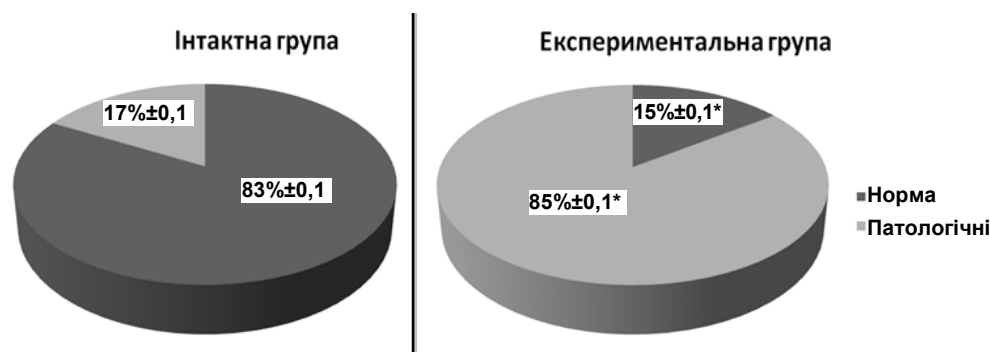


Рис. 4. Порівняльна характеристика стану судин оболонки зародків інтактної групи та експериментальної з введеним терморозширеним графітом (* $p \leq 0,05$)

Не зважаючи на погіршення стану зародків експериментальних груп у зв'язку із порушенням цілісності яйця при введенні матеріалів, за сумою усіх показників очевидно є негативна роль технічного вугілля та алмазних наночастинок, що уповільнювали ембріогенез, спричинювали порушення в судинах жовткового мішка та органах зародків. Найбільш шкідливим фактором для ембріогенезу виявився терморозширений графіт.

Висновки. За даними макроскопічної оцінки стану курячих ембріонів з інтактної та експериментальних груп було показано достовірні відмінності показників ембріогенезу у зародків, що зазнали впливу технічного вугілля, алмазних наночастинок та терморозширеного графіту. Для групи з активованим вугіллем кількість маленьких ембріонів була значно меншою, ніж у інтактній групі, що свідчить на користь тенденції до позитивного впливу активованого вугілля на перебіг процесів ембріогенезу. Достовірна різниця між кількістю зародків із порушеною судинною оболонкою у групі із сажею та інтактній групі вказує на негативний вплив сажі на судини. Вплив алмазних наночастинок на ембріогенез характеризується достовірним зменшенням розмірів зародків та погіршенням стану їх судин. Найтяжчими були наслідки введення ембріонам терморозширеного графіту – спостерігалась гостра і швидка реакція як щодо стану зародків, так і щодо стану їх судин.

Список використаних джерел

1. Concordance between in vitro and in vivo dosimetry in the proinflammatory effects of low-toxicity, low-solubility particles: the key role of the proximal alveolar region / K. Donaldson, P. J. Borm, G. Oberdorster, K. E. Pinkerton, V. Stone, C. L. Tran // *Inhal Toxicol.* – 2008. – Vol. 20. – P. 53–62.
2. Schrand A. M. Are diamond nanoparticles cytotoxic? / A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – Vol. 111, N.1. – P. 2–7.
3. Bakowicz-Mitura K. Influence of diamond powder particles on human gene expression / K. Bakowicz-Mitura, G. Bartosz, S. Mitura // *Surf. Coat. Technol.* – 2007. – Vol. 201. – P. 6131–6135.
4. Detection of Single Photoluminescent Diamond Nanoparticles in Cells and Study of the Internalization Pathway // Orestis Faklaris, Damien Garrot, Vandana Joshi et al. // *Small.* – 2008. – Vol. 4, N.12. – P. 2236–2239.
5. Biodistribution and toxicity of nanodiamonds in mice after intratracheal instillation / X. Zhang, J. Yin, C. Kang et al. // *Toxicol. Lett.* – 2010. – Vol. 198, N. 2. – P. 237–243.
6. Robertson J. A Case-control Study of Circulatory, Malignant and Respiratory Morbidity in Carbon Black Workers in the USA / J. Robertson, T. Ingalls // *American Industrial Hygiene Association Journal.* – 1989. – Vol. 50, N. 10. – P. 510–515.
7. Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice / Yuan Yuan, Xiang Wang, Guang Jia et al. // *Diamond and Related Materials.* – 2010. – Vol. 19, N.4. – P. 291–299.
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. – P. 2199.
9. Comparison of photoluminescence properties of semiconductor quantum dots and non-blinking diamond nanoparticles and observation of the diffusion of diamond nanoparticles in cells / O. Faklaris, D. Garrot, V. Joshi et al. // *Journal of the European Optical Society.* – 2009. – Vol. 4. – P. 2236.
10. In Vivo Imaging and Toxicity Assessments of Fluorescent Nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans* / Nitin Mohan, Chao-Sheng Chen, Hsiao-Han Hsieh et al. // *Nano Lett.* – 2010. – Vol. 10, N. 9. – P. 3692–3699.

Надійшла до редколегії 24.11.14

В. Лавриненко, старш. лаб., Ю. Чайковський, д-р мед. наук
Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ УГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ РАЗНОЙ ДИСПЕРСНОСТИ НА МАКРОСКОПИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭМБРИОГЕНЕЗА КУРИЦЫ

Исследовали влияние углеродных материалов разной дисперсности на куриные зародыши, полученные при инкубировании яиц линии Хай-Лайн белый. Раствор активированного угля, алмазных наночастинок, технического угля и терморасширенного графита на биосовместимом декстране вводили в желточный мешок зародышей на 3 сутки инкубации и проводили оценку размеров эмбрионов и состояния стенок сосудов их желточного мешка на 6, 14 и 20 сутки инкубации. При тех же условиях с экспериментальными группами инкубировали яйца из интактной группы, которые не подвергались никаким посторонним влияниям. Было показано негативное влияние технического угля на состояние стенок сосудов желточного мешка зародышей, алмазных наночастинок и технического угля на оба макроскопических показателя эмбриогенеза курицы.

Ключевые слова: эмбриогенез курицы, активированный уголь, сажа, алмазные наночастицы, терморасширенный графит, сосуды стенок желточного мешка.

V. Lavrinenko, lab., Yu. Chaykovskiy, DSc
Bogomolets national medical university, Kyiv, Ukraine

EFFECTS OF CARBONIC MATERIALS OF VARIOUS SIZES ON MACROSCOPIC INDICES OF CHICKEN EMBRYOGENESIS

The influence of carbon materials of various sizes on chicken embryos, obtained from the incubation of eggs from the breed High line white was researched. Solution of activated charcoal, nanodiamonds, soot and thermo-activated graphite on biocompatible dextran was injected into the embryos' yolk sack on the third day of incubation and evaluation of their size and condition of the yolk sack wall vessels was held on the sixth, fourteenth and twentieth days of incubation. The eggs from the intact group were incubated within the same conditions but weren't influenced by any external factors. The negative effect of the soot on condition of the yolk sack wall vessels and of the nanodiamonds and thermo-activated graphite on the both indexes of chicken embryogenesis were shown.

Key words: chicken embryogenesis, activated charcoal, soot, nanodiamonds, thermo-activated graphite, yolk sack wall vessels.