

УДК 611.811.018.: 546.48.:599.323.4.:612.648

Т.В. Козицька, Ю.Б. Чайковський
ДУ «Інститут медицини праці» НАМН України, Національний медичний університет імені
О.О. Богомольця, м. Київ

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ГІПОКАМПУ НОВОНАРОДЖЕНИХ МИШЕЙ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ НАНОЧАСТИНОК CdS ТА СОЛІ CdCl₂

Проведено дослідження токсичного впливу наночастинок CdS та солі CdCl₂ на ембріональний розвиток головного мозку мишей. Вивчено морфологічні зміни гіпокампу новонароджених мишей, що розвиваються під впливом кадмію. Встановлено, що наночастинок CdS здійснюють значний токсичний вплив на гіпокамп плоду в різних дозах, викликають набряк мозку та загибель нейронів гіпокампу. Наночастинок CdS здійснюють більш виражений нейротоксичний вплив на гіпокамп новонароджених мишей, ніж сіль CdCl₂. Ступінь вираженості токсичного ефекту наночастинок CdS прямо пропорційний їх дозі та розміру.

Ключові слова: наночастинок CdS, хлорид кадмію, поліфосфат натрію, нейротоксичність, пренатальний період.

Робота є фрагментом планової наукової роботи кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Вивчення нервової, імунної систем та серця за умов дії екзогенних та ендогенних факторів» (номер державної реєстрації 0109U000091).

Поступ науково-технічного прогресу зумовив виникнення нового міждисциплінарного підходу – нанонауки. Незважаючи на вражаючі перспективи застосування нанотехнологій, унікальні властивості наночастинок, матеріали на їх основі викликають занепокоєння щодо їх біологічної токсичності.

Активне використання наночастинок (НЧ) CdSe та CdS в оптоелектроніці, лазерній техніці, біомедичних дослідженнях пов'язане з їх оптичними властивостями. Кадмій є одним із найбільш токсичних важких металів, що негативно впливає на функціонування органів та систем людини і тварин [3; 5]. Його сполуки характеризуються вираженим токсичним впливом, здатністю до накопичення і повільного виведення з організму. Результати попередніх досліджень показують, що НЧ CdSe інгібують розвиток мезенхімальних стовбурових клітин людини, викликають пригнічення контактного орієнтування клітин та апоптоз [5]. Доведено здатність НЧ CdSe до індукції відкриття кальцієвих каналів плазмалемі і ендоплазматичної сітки у нейронах гіпокампу [4, 6]. НЧ CdSe можуть викликати дозозалежну загибель нейронів. Їх введення призводить до збільшення часу активації і уповільнення відновлення натрієвих каналів, зменшення фракції робочих потенціал-залежних натрієвих каналів [8]. Слід зазначити, що НЧ CdSe також зумовлюють внутрішньоклітинну акумуляцію ліпідів, індукують вмикання системи HIF (англ. hypoxia-inducible transcription factors) у гліальних клітинах, викликають зниження життєздатності фібробластів, деполімеризацію їх цитоскелета, появу аномальних форм ядер, утворення вільних радикалів [7]. Таким чином, дослідження останніх років вказують на певну цито- та ембріотоксичність кадмієвих НЧ. Проте, нез'ясованими залишаються важливі питання – впливу розміру, концентрації НЧ, природи стабілізатора тощо.

Метою роботи було дослідити вплив НЧ CdS на гіпокамп новонароджених мишей, провести порівняльне дослідження впливу різних доз та різних розмірів НЧ CdS, порівняти вплив НЧ CdS та солі CdCl₂ на гіпокамп новонароджених мишей.

Матеріал та методи дослідження. Колоїдні розчини НЧ CdS отримували шляхом взаємодії хлориду кадмію та сульфідів натрію у присутності ПФН, що відігравав у системі роль стабілізатора НЧ.

Експерименти були проведені на 60 білих мишах вагою 18-22 г. Тварини, що були використані у роботі, утримувались у стандартних умовах віварію. Експериментальні тварини були розподілені на 5 груп, кожна з яких, окрім першої, складалась із 3 підгруп. Вагітним мишам першої контрольної групи вводили фізіологічний розчин. До другої контрольної групи увійшли тварини, яким вводили стабілізатор НЧ поліфосфат натрію (ПФН) в дозі 0,9; 1,8 та 3,6 мг/кг. Третю та четверту дослідні групи склали тварини, яким вводили НЧ CdS розміром 4-8 нм та 15-20 нм відповідно, в дозі 0,9; 1,8 та 3,6 мг/кг. До п'ятої групи увійшли тварини, яким вводили хлорид кадмію (CdCl₂) в дозі 0,9; 1,8 та 3,6 мг/кг. Вказані речовини вводили вагітним мишам один раз на добу на 12-15 день вагітності інтраперитонеально впродовж п'яти днів.

Після народження мишенят проводили евтаназію шляхом декапітації, видаляли головний мозок та поміщали в 10% розчин нейтрального формаліну. Після проведення стандартної спиртової проводки та заливки в парафін, із дослідних зразків отримували парафінові зрізи товщиною 6-8 мкм, які фарбували гематоксиліном та еозином. На профарбованих препаратах фронтальних зрізів головного мозку мишей досліджували морфологічні зміни гіпокампу. Вивчали зміни площі ядер та перикаріону нейронів, підраховували загальну кількість нейронів та відсоток загинувих клітин. Кількість клітин в CA1 та CA2/3 зонах підраховували в рамках (тест-зонах) 200×130 мкм. В межах тест-зони рахували загальну кількість нейронів та кількість нейронів, що характеризуються морфологічними змінами, які в науковій літературі розглядаються як патологічні [1, 2]. Нейрони з ознаками некрозу мали нечіткі межі клітин. У таких клітинах спостерігалися: набухання ядер та перикаріону, нечіткість контуру ядер (каріолізис), порушення цілісності нейролеми. Нейрони, які мали гіперхромне конденсоване ядро та сому (пикнотично змінені), вважали апоптично зміненими. Також до числа

дегенеративних включали клітини із значними деструктивними змінами (“тіні”). Статистичну обробку даних здійснювали з використанням критерію Стьюдента та Вілкоксона, застосовуючи програму “Statistica 6.0”.

Результати дослідження та їх обговорення. При дослідженні морфологічних змін у гіпокампі новонароджених мишей, що відбуваються під впливом НЧ CdS та солі CdCl₂ встановлено їх виражений нейротоксичний ефект. Введення токсикантів спричиняло набряк тканин мозку, формування перичелюлярних набряків та гідропічні зміни нейронів. Такі патологічні зміни спостерігались за умов введення трьох доз наночастинок обох розмірів, проте найбільший токсичний вплив встановлено при дозі 3,6 мг/кг. Дія CdCl₂ виявилась менш токсичною, ніж наночастинок (табл. 1).

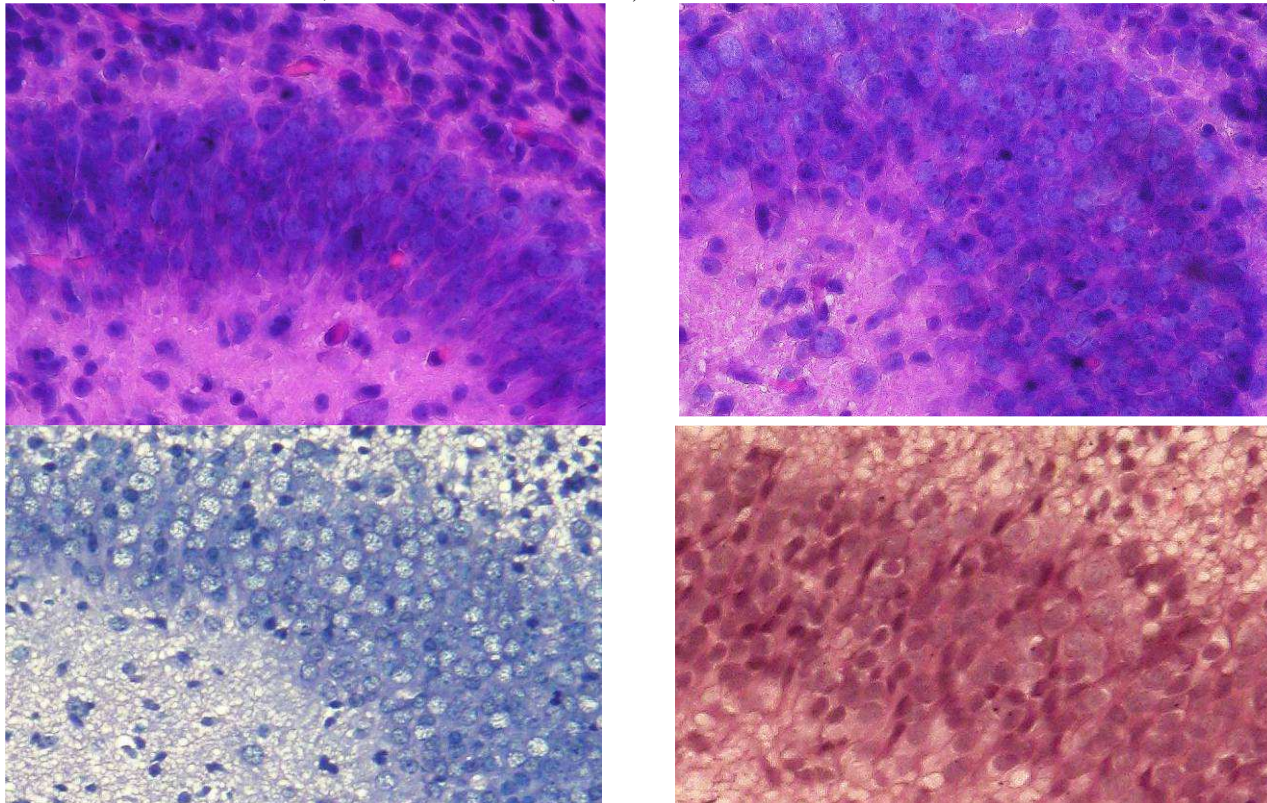


Рис. Морфологічні зміни у СА2/3 зоні гіпокампу: А – контроль (ПФН); Б – з хлоридом кадмію (0,9 мг/кг); В – з наночастинками CdS (4-8 нм) 0,9 мг/кг; Г – з наночастинками CdS (15-20 нм) 0,9 мг/кг. Об.40, ок. 12.

Таблиця 1

Вплив НЧ CdS на виживання нейронів гіпокампу новонароджених щурів (кількість клітин/тест-зону)

Група	CA1			CA2/3		
	Загальна кількість	Кількість загиблих	Відсоток загиблих	Загальна кількість	Кількість загиблих	Відсоток загиблих
Фізіологічний розчин	93,7±1,9	3,6±0,4	3,8±0,4	120,0±2,5	4,1±0,3	3,4±0,3
ПФН 0,9мг/кг	94,1±2,4	4,7±0,6	4,3±0,5	117,1±2,0	5,3±0,9	4,4±0,7
ПФН 1,8мг/кг	96,8±2,9	3,1±0,7	3,1±0,7	113,6±3,3	5,5±0,4	4,8±0,3a
ПФН 3,6мг/кг	96,9±2,4	5,1±0,8	5,1±0,7	116,8±1,6	9,0±1,2	7,6±1,0a,e
НЧ CdS (4-8 нм) 0,9мг/кг	94,7±3,3	6,4±1,2	6,8±1,3	119,9±2,8	21,6±1,4	17,9±1,0a,b
НЧ CdS (4-8 нм) 1,8мг/кг	93,6±2,3	13,5±1,5	14,2±1,4a,b,e	126,0±2,4	25,2±1,7	19,9±1,4a,b
НЧ CdS (4-8 нм) 3,6 мг/кг	93,9±2,9	11,2±1,2	11,7±1,1a,b	116,7±3,2	22,7±2,2	19,2±1,7a,b
НЧ CdS (15-20 нм) 0,9 мг/кг	99,8±4,1	12,9±4,1	12,7±1,6a,b,c	122,3±4,0	13,4±1,0	10,9±0,8a,b,c
НЧ CdS (15-20 нм) 1,8 мг/кг	89,8±3,4	14,7±0,9	16,5±1,2a,b	118,5±4,0	23,5±1,3	19,8±1,1a,b,e
НЧ CdS (15-20 нм) 3,6 мг/кг	99,0±3,0	19,6±0,9	19,7±0,8a,b,c	116,5±3,3	24,5±1,1	21,4±1,2a,b
CdCl ₂ 0,9 мг/кг	97,9±2,5	4,0±0,4	4,1±0,5c,d	121,8±3,1	5,3±0,8	4,3±0,7c,d
CdCl ₂ 1,8 мг/кг	97,4±4,5	7,8±1,0	8,1±1,2a,b,c,d,e	116,7±3,1	10,0±2,3	8,7±2,1a,b,c,d,e
CdCl ₂ 3,6 мг/кг	95,5±3,5	6,5±0,4	6,9±0,6a,c,d	115,1±3,7	9,8±0,9	8,6±1,0a,c,d

Примітка: а – достовірно по відношенню до фізіологічного розчину (p<0,05); б – достовірно по відношенню до відповідної дози ПФН (p<0,05); с – достовірно по відношенню до відповідної дози CdS (4-8 нм) (p<0,05); d – достовірно по відношенню до відповідної дози CdS (15-20 нм) (p<0,05); e – достовірно по відношенню до меншої дози в межах однієї групи (p<0,05).

При введенні тваринам CdCl₂ в дозі 0,9 мг/мл достовірного збільшення нейродегенерації, порівняно із контрольними показниками, не встановлено. При дозі 1,8 мг/кг кількість загиблих клітин в СА1 секторі складала 8,1±1,2%, а в СА2/3 – 8,7±2,1%. Введення більшої дози не супроводжувалось достовірним збільшенням загибелі нейронів гіпокампу. При цьому, вже при введенні малих доз CdCl₂, відбувається збільшення морфометричних показників нейронів, що пов'язано із гідропічними порушеннями в клітинах. При цьому структурно-анатомічних порушень не спостерігали. Нейрони в СА1 та СА2/3 були щільно розташовані,

їхні ядра мали овальну, рідше округлу форму (Рис. 1Б). Зустрічалися лише поодинокі загиблі гідропічно змінені нейрони, а більшість неушкоджених містили ядро без ознак деформації.

При введенні НЧ CdS (4-8 нм) встановлено значний розвиток нейродегенеративного процесу. Достовірне збільшення загибелі нейронів гіпокампу спостерігали в обох досліджуваних зонах, пороте інтенсивніше цей процес спостерігали в СА2/3 зоні (табл. 1). Кількість загиблих клітин у гіпокампі при дозі 0,9 мг/кг становила 6,8±1,3% для СА1 зони і 17,9±1,0% для СА2/3. При дозі 3,6 мг/кг процес нейродегенерації досягав 11,7±1,1% і 19,2±1,7% відповідно. Встановлено суттєве збільшення морфометричних показників ушкоджених нейронів, що обумовлено набряканням їх ядер та цитоплазми (Рис. 1В, табл. 2).

Введення тваринам НЧ CdS (15-20 нм) супроводжувалось суттєвим набряком тканини мозку, що викликало загибель значної кількості нейронів. НЧ CdS (15-20 нм) характеризуються найбільш вираженим токсичним впливом на нейрони гіпокампу, порівняно із хлоридом кадмію та наночастинками менших розмірів. Найбільшу кількість загиблих клітин спостерігали при введенні НЧ в дозі 3,6 мг/кг. Цей показник склав 19-22% (табл. 1). Морфологічні порушення характеризувались розвитком значного набряку тканини мозку, що супроводжувалось набряканням тіл нейронів (рис. 1Г).

Таблиця 2

Вплив CdS на морфометричні показники нейронів гіпокампу новонароджених мишей (мкм²)

Група	СА1-зона		СА2/3-зона	
	Площа ядра	Площа нейрона	Площа ядра	Площа нейрона
Фізіологічний розчин	60,18±1,2	97,41±1,2	69,40±1,2	102,5±1,3
ПФН 0,9мг/кг	59,48±0,6	96,37±0,7	69,92±0,6	104,44±0,6
ПФН 1,8мг/кг	60,82±0,6	98,55±0,5e	70,77±0,5	103,67±0,6
ПФН 3,6мг/кг	67,38±0,8a,e	100,69±0,6e	80,87±0,6e	105,17±0,7
НЧ CdS (4-8 нм) 0,9 мг/кг	72,93±0,9a,b	124,37±0,8a,b	91,91±0,7a,b	124,31±0,5a,b
НЧ CdS (4-8 нм) 1,8 мг/кг	89,62±0,8a,b,e	125,18±0,7a,b	92,39±0,7a,b	124,70±0,9a,b
НЧ CdS (4-8 нм) 3,6 мг/кг	79,04±0,7a,b,e	115,82±1,0 a,b,e	93,69±0,7a,b	125,4±1,9a,b
НЧ CdS (15-20 нм) 0,9мг/кг	77,92±0,8a,b,c	107,79±1,1a,b,c	90,85±0,8a,b	125,28±1,0a,b
НЧ CdS (15-20 нм) 1,8 мг/кг	89,48±0,9a,b,e	124,40±1,0a,b,e	99,42±0,6a,b,c,e	127,86±0,1a,b,c
НЧ CdS (15-20 нм) 3,6 мг/кг	88,92±1,3a,b,c	122,46±0,9a,b,c	99,16±0,7a,b,c	130,52±0,6a,b,e,c
CdCl ₂ 0,9мг/кг	82,76±1,8a,b,c,d	103,87±2,7a,b,c,d	83,14±1,6a,b,c,d	102,02±2,9c,d
CdCl ₂ 1,8мг/кг	84,17±1,9a,b,c,d	102,54±2,8a,b,c,d	82,54±2,1a,b,c,d	103,32±2,2c,d
CdCl ₂ 3,6мг/кг	89,60±2,0a,b,e,c,d	109,34±3,1a,b,e,c,d	84,68±2,6a,b,c,d	112,49±2,9a,b,e,c,d

Примітка: а – достовірно по відношенню до фізіологічного розчину ($p<0,05$); b – достовірно по відношенню до відповідної дози ПФН ($p<0,05$); с – достовірно по відношенню до відповідної дози CdS (4-8 нм) ($p<0,05$); d – достовірно по відношенню до відповідної дози CdS (15-20 нм) ($p<0,05$); e – достовірно по відношенню до меншої дози в межах однієї групи ($p<0,05$).

Ці порушення вплинули на морфометричні показники нейронів гіпокампу (табл. 2).

Науковий

Кадмій у складі наночастинок CdS та солі CdCl₂ характеризується значним токсичним впливом на ембріональний розвиток гіпокампу мишей. Характерними особливостями інтоксикації є гострий набряк тканини мозку та клітин. Уражені нейрони характеризуються гідропічним набряканням тіл та ядер, навколо клітин відмічаються перичелюлярні набряки. Морфологічні порушення реєструються вже при малих дозах токсикантів. При цьому введення більших доз викликає гострий набряк мозку та загибель значної кількості нейронів гіпокампу. Наночастинки CdS мають більш виражений нейротоксичний вплив на гіпокамп новонароджених мишей, ніж сіль CdCl₂. Слід зазначити, що ступінь вираженості токсичного ефекту наночастинок CdS прямо пропорційний їхній дозі та розміру.

Література

- Васильев Д.С. Формирование конечного мозга крыс после нарушения эмбрионального развития, вызванного пренатальной гипоксией: Авт. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13./03.00.25 / Д.С. Васильев. – СПб. – 2007. – 24 с.
- Влияние тиотриазолина на гистоморфологические изменения нейронов коры и гиппокампа в постинсультный период / И.Ф. Беленичев, И.А. Мазур, Ю.М. Колесник [и др.] // Новости медицины и фармации. – 2007. – 5 (209). – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://novosti.mif-ua.com/archive/issue-3094/article-3189/>
- Лихацький П.Г. Поєднаний вплив солей кадмію, кобальту та радіаційне опромінення на захисні системи тварин та шляхи корекції виявлених порушень / П.Г. Лихацький // Авт. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. – Львів. – 2007. – 22 с.
- Chan W.H. CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals / W.H. Chan, N.H. Shiao, P.Z. Lu // Toxicol Lett. – 2006. – Vol. 167. - № 3. – P. 191-200.
- Hsieh M.S. Cytotoxic Effects of CdSe Quantum Dots on Maturation of Mouse Oocytes, Fertilization, and Fetal Development / M.S. Hsieh, N.H. Shiao, W.H. Chan // Int J Mol Sci. – 2009. – Vol. 10. - № 5. – P. 2122-2135.
- Mechanisms of unmodified CdSe quantum dot-induced elevation of cytoplasmic calcium levels in primary cultures of rat hippocampal neurons / M. Tang, M. Wang, T. Xing [et al.] // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29. - № 33. – P. 4383-4391.
- Nanoparticles can induce changes in the intracellular metabolism of lipids without compromising cellular viability / E. Przybytkowski, M. Behrendt, D. Dubois [et al.] // FEBS J. – 2009. – Vol. 276. - № 21. – P. 6204-6217.
- Unmodified CdSe quantum dots induce elevation of cytoplasmic calcium levels and impairment of functional properties of sodium channels in rat primary cultured hippocampal neurons / M. Tang, T. Xing, J. Zeng [et al.] // Environ. Health Perspect. – 2008. – Vol. 116. - № 7. – P. 915-922.

Реферати

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГИППОКАМПА
НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ
НАНОЧАСТИЦ CdS И СОЛИ CdCl₂**

Козыцка Т.В., Чайковский Ю.Б.

Проведено исследование токсического влияния наночастиц CdS и соли CdCl₂ на эмбриональное развитие головного мозга мышей. Изучены морфологические изменения гиппокампа новорожденных мышей, развивающиеся под влиянием кадмия. Установлено, что наночастицы CdS осуществляют значительное токсичное влияние на гиппокамп плода в разных дозах, вызывают отек мозга и гибель нейронов гиппокампа. Наночастицы CdS осуществляют более выраженное нейротоксическое влияние на гиппокамп новорожденных мышей, чем соль CdCl₂. Степень выраженности токсического эффекта наночастиц CdS прямо пропорциональна их дозе и размеру.

Ключевые слова: наночастицы CdS, хлорид кадмия, полифосфат натрия, нейротоксичность, пренатальный период.

Стаття надійшла 16.07.2012 р.

**MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE NEWBORN
MICE HIPPOCAMPUS UNDER CdS
NANOPARTICLES AND CdCl₂ SALT INTRODUCTION**

Kozytska T.V., Chaikovskiy Yu.B.

The research of CdS nanoparticles and cadmium chloride influence on mice brain embryonal development was carried out. The morphological changes of new-born mice hippocampus which develop under the influence of cadmium were studied. It was established that CdS nanoparticles had pathological influence on the fetal hippocampus in different doses and caused cerebral edema and neuronal death in hippocampus. CdS nanoparticles had more expressed neurotoxic influence on new-born mice hippocampus, than cadmium chloride. Degree of CdS nanoparticles toxic effect was directly proportional to their dose and size.

Key words: CdS nanoparticles, cadmium chloride, sodium polyphosphate, neurotoxicity, prenatal period.

УДК 611.447.013

Л.П. Даврів

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

**ТОПОГРАФО-АНАТОМІЧНІ ВЗАЄМВІДНОШЕННЯ ПРИВУШНОЇ СЛИННОЇ ЗАЛОЗИ З
ПРИЛЕГЛИМИ ОРГАНАМИ І СТРУКТУРАМИ У 10-МІСЯЧНИХ ПЛОДІВ ЛЮДИНИ**

На 5 плодах людини 346,0-375,0 мм тім'яно-куприкової довжини (10 місяців внутрішньоутробного розвитку) за допомогою методів звичайного і тонкого препарування під контролем бінокулярної лупи, макромікроскопії та морфометрії вивчено анатомічні особливості органів і структур привушно-жувальної ділянки. Виявлено ущільнення фасціально-клітковинних утворень в місцях тісних топографо-анатомічних взаємовідношень її органів і структур.

Ключові слова: привушна слинна залоза, пренатальний онтогенез, людина.

Дослідження є фрагментом планової комплексної міжкафедральної теми „Закономірності перинатальної анатомії та ембріотопографії. Визначення статеві-вікових особливостей будови і топографоанатомічних взаємовідношень органів та структур в онтогенезі людини”, № державної реєстрації 01100003078.

Стрімкий розвиток ендоскопічної хірургії та мікрохірургії вимагає від морфологів всебічних досліджень закономірностей будови і становлення топографо-анатомічних взаємовідношень органів і структур різних систем у плодному періоді онтогенезу людини. Адекватне проведення сонографічних досліджень, виконання хірургічних операцій на органах плода в утробі матері, тлумачення результатів сучасних діагностичних прийомів (комп'ютерної й магнітно-резонансної томографій) та розтинів плоду базуються на об'єктивних анатомічних даних [2, 3, 11].

Аналіз наукової літератури свідчить, що привушна слинна залоза (ПСЗ), як і привушно-жувальна ділянка в цілому, є об'єктом пильної уваги науковців. У літературі висвітлюються розрізнені дані про особливості морфогенезу ПСЗ [5, 6, 9, 12] та становлення топографії складових утворень привушно-жувальної ділянки [1, 8, 10]. Разом з тим відомості щодо типової і варіантної анатомії органів та структур привушно-жувальної ділянки, становлення їх корелятивних взаємовідношень упродовж плодового періоду розвитку людини залишаються недостатньо вивченими. Дискусійними та суперечливими є дані про синтопію ПСЗ та судинно-нервові утворення. Відсутні комплексні дослідження їх морфогенезу в перинатальному періоді онтогенезу. Складність топографо-анатомічних взаємовідношень ПСЗ із компонентами привушно-жувальної ділянки в перинатальному періоді онтогенезу людини [7] засвідчує потребу вивчення особливостей становлення топографії органів і структур ділянки ПСЗ у 10-місячних плодів.

Метою роботи було з'ясування топографо-анатомічних взаємовідношень ПСЗ з прилеглими органами та структурами, фасціально-клітковинними та судинно-нервовими утвореннями в межах привушно-жувальної ділянки у плодів 10-и місяців внутрішньоутробного розвитку.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проведено на 5-и плодах людини 10-и місяців внутрішньоутробного розвитку (ВУР); 346,0-375,0 мм тім'яно-куприкової довжини (ТКД). Усі дослідження проведені з дотриманням основних біоетичних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997 р.), Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964–2008 рр.), а також наказу МОЗ України №