**Лавриненко Вікторія Євгенівна, старший лаборант ка&shy;федри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця: &laquo;Біологічний вплив вуглецевих матеріалів різної дисперсності на курячі ембрі&shy;они&raquo; (03.00.11 - цитологія, клітинна біологія, гістологія). Спецрада Д 26.001.38 у Київському національному універ&shy;ситеті імені Тараса Шевченка**

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**імені О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

**На правах рукопису**

**Лавриненко Вікторія Євгенівна**

**УДК 591.3:598.6:546.26**

**БІОЛОГІЧНИЙ ВПЛИВ ВУГЛЕЦЕВИХ МАТЕРІАЛІВ РІЗНОЇ**

**ДИСПЕРСНОСТІ НА КУРЯЧІ ЕМБРІОНИ**

**03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія**

**Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук**

**Науковий керівник:**

**завідувач кафедри гістології та ембріології**

**НМУ імені О.О. Богомольця,**

**член-кор. НАМН України, д.м.н., професор**

**Чайковський Юрій Богданович**

**Київ – 2016**

**2**

**ЗМІСТ**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ………………………………………............4**

**ВСТУП……………………………………...…………………..………………............5**

**РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ…………………………….………..……..........11**

**1.1. Дані про вплив вугілля різної дисперсності на живі системи………..…..........11**

**1.1.1. Дані щодо біологічних ефектів активованого вугілля.....................................11**

**1.1.2. Дані щодо біологічних ефектів технічного вугілля.........................................13**

**1.1.3. Дані щодо біологічних ефектів алмазних наночасточок.................................17**

**1.1.4. Дані щодо біологічних ефектів терморозширеного графіту...........................23**

**1.2. Закономірності ембріогенезу курки………………………………...…...............24**

**1.3. Узагальнення даних літератури та обґрунтування напрямку досліджень........30**

**РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ…………….….............32**

**2.1. Об’єкти дослідження..............................................................................................32**

**2.2. Досліджувані матеріали.........................................................................................34**

**2.3. Методики макроскопічних досліджень................................................................35**

**2.4. Методики гістологічних досліджень....................................................................37**

**2.5. Методики електронно-мікроскопічних досліджень............................................37**

**РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ МАКРОСКОПІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ……............39**

**3.1. Опис стану зародків з експериментальних груп та їх провізорних органів.....39**

**3.2. Результати статистичної обробки макроскопічних показників**

**ембріогенезу………………………………………………………………..…............46**

**РОЗДІЛ 4 РЕЗУЛЬТАТИ ГІСТОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ…………..........52**

**4.1. Результати дослідження контрольної групи…………………………...............52**

**4.2. Результати дослідження групи із введеним активованим вугіллям……..........56**

**4.3. Результати дослідження групи із введеним технічним вугіллям………..........61**

**4.4. Результати дослідження групи із введеними алмазними**

**наночасточками…………………………………………………………...…..............71**

**4.5. Результати дослідження групи із введеним терморозширеним**

**графітом………………………………………………………………………..............77**

**3**

**4.6. Результати статистичної обробки даних площі епітелію ниркових канальців**

**контрольної та експериментальних груп……………………..……………..............82**

**РОЗДІЛ 5 РЕЗУЛЬТАТИ ЕЛЕКТРОННОМІКРОСКОПІЧНИХ**

**ДОСЛІДЖЕНЬ…………………………………………………………..…...............85**

**5.1. Результати дослідження контрольної групи……………………….……...........85**

**5.2. Результати дослідження групи із введеним активованим вугіллям……..........94**

**5.3. Результати дослідження групи із введеним технічним вугіллям……............103**

**5.4. Результати дослідження групи із введеними алмазними**

**наночасточками……………………………………………………….…..................109**

**5.5. Результати дослідження групи із введеним терморозширеним**

**графітом…………………………………………………………………..…..............116**

**РОЗДІЛ 6 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ…...........121**

**ВИСНОВКИ………………………………………………………….……..............137**

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ………………………………...............139**

**4**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

**АВ – активоване вугілля**

**АНЧ – алмазні наночасточки**

**ГЕПС – гранулярна ендоплазматична сітка**

**ЕГ – експериментальна група**

**ЖМ – жовтковий мішок**

**ІГ – інтактна група**

**КГ – контрольна група**

**РСВ – респіраторно-синцитіальний вірус**

**ТВ – технічне вугілля, сажа**

**ТРГ – терморозширений графіт**

**ХОЗЛ – хронічні обструктивні захворювання легень**

**ЧА – часточки аерозолів**

**ШКТ – шунково-кишковий тракт**

**TNF-α - фактор некрозу пухлин**

**IL - інтерлейкін**

**5**

**ВСТУП**

**Актуальність обраної теми дослідження. Зростаючий інтерес до**

**застосування вуглецевих наноматеріалів у медицині не викликає сумнівів.**

**Препарати на основі вуглецевих наноматеріалів широко використовуються для**

**лікування пухлин, адресної доставки ліків та візуалізації певних структур у**

**тканинах [1–10]. 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 [11]. Крім того, тератогенний ефект вуглецевих**

**наночасточок лишається практично недослідженим.**

**Загалом вважається, що активоване вугілля (АВ) не здатне проникати у**

**тканини організму і абсолютно інтактне, тому з давніх часів використовується в**

**медицині [12, 13]. Проте технологія приготування АВ, котра передбачає вплив**

**високих температур, може супроводжуватись утворенням дрібних часточок з**

**великою проникною здатністю, зокрема — нанорозмірних [14].**

**Аналогічною є ситуація з терморозширеним графітом (ТРГ), що переважно**

**використовується у промисловості і лише опосередковано – в медицині (матриця**

**для синтезу нанотрубок) [15], адже для розширення просторів у кристалічній**

**решітці природно-кристалічного графіту використовують хімічні сполуки і**

**високу температуру [16].**

**Більшість досліджень патологічних ефектів технічного вугілля (сажі) (ТВ)**

**стосується потенційних ризиків для здоров'я при згоранні дизельного палива та**

**фабричних емісій, де міститься велика кількість інших речовин [17–33]. 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 [11, 34–38]. Значна частина авторів, що заперечують патогенну дію сажі**

**на живі організми, спирається на фрагментарне сприйняття її властивостей:**

**оскільки сажа майже повністю складається з карбону, вона ніяким чином не**

**включається в метаболізм і після інгаляції з часом просто виводиться з організму**

**6**

**за допомогою мукоциліарного транспорту. Вочевидь така інтерпретація**

**біологічних ефектів сажі не зовсім коректна.**

**Все більшу увагу промисловості, пов'язаної з наноматеріалами,**

**привертають розробки алмазних наночасточок (АНЧ). Вони наділені унікальними**

**характеристиками – біосумісністю, низькою хімічною реактивністю, оптичною**

**прозорістю, надзвичайною міцністю тощо. Сучасні публікації все частіше**

**описують різноманітні дивовижні властивості і шляхи їх застосування: в якості**

**біосенсорів, переносників ліків, засобів візуалізації певних структур чи**

**імобілізації білків [1–6, 39]. 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 АНЧ.**

**Незважаючи на наявність різноманітних досліджень біологічного впливу**

**вуглецевих матеріалів їх тератогенний ефект лишається практично**

**недослідженим.**

**Використання різних типів вуглецевих наночасточок у медицині зараз**

**перебуває на роздоріжжі між перевіркою їх біологічних властивостей і**

**застосуванням для лікувальних та діагностичних програм [40–44]. Прогрес у**

**клінічних випробуваннях буде залежати від підсумків токсикологічних**

**досліджень та результатів вивчення ефективності, що уможливить оптимальне**

**співвідношення ризиків і користі використання цих структур людиною [45-48].**

**Усе вищесказане обумовило вибір теми та матеріалів дослідження, адже**

**саме стандартизований підхід до оцінки впливу вугілля різної дисперсності**

**уможливить встановлення взаємозв’язків між будовою та біологічними ефектами**

**цих речовин.**

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

**Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідної теми кафедри**

**гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О.**

**7**

**Богомольця «Органи нервової, імунної та сечостатевої систем в умовах**

**експериментального пошкодження» № д/р 0112U001413 (2011-2015 рр.).**

**Мета і завдання дослідження – визначення впливу вуглецевих матеріалів**

**різної дисперсності на організм, що розвивається, та оцінка проникної здатності і**

**тропності до тканин.**

**Досягнення мети передбачало вирішення наступних завдань:**

**1. Встановити вплив вуглецевих матеріалів різної дисперсності на розвиток**

**курячих ембріонів на макроскопічному рівні.**

**2. Оцінити вплив вуглецевих матеріалів різної дисперсності на структурні**

**компоненти зародків курей протягом усіх етапів ембріогенезу на**

**клітинному та субклітинному рівнях.**

**3. З’ясувати спроможність та встановити шляхи переміщення досліджуваних**

**матеріалів в живому організмі, їх тропність до різних тканин.**

**4. Встановити здатність вуглецевих матеріалів різної дисперсності**

**проходити крізь стінки кровоносних судин, проникати в тканини і**

**клітини.**

**5. Оцінити вірогідність тератогенних ефектів досліджуваних матеріалів.**

**Об'єкт дослідження — вплив вуглецевих матеріалів різної дисперсності на**

**живі організми.**

**Предмет дослідження — біологічні ефекти вуглецевих матеріалів різної**

**дисперсності щодо організмів, які розвиваються.**

**Методи дослідження: у роботі використовували макроскопічні, оглядові**

**гістологічні, електронно-мікроскопічні методи та морфометрію з подальшим**

**статистичним аналізом результатів.**

**Наукова новизна одержаних результатів. Вперше морфологічно**

**верифіковано біологічні ефекти вуглецевих часточок різної дисперсності щодо**

**структурних компонентів організму на різних етапах ембріонального розвитку.**

**Одержано дані щодо шляхів поширення досліджуваних матеріалів в**

**організмі та проникної здатності кожного матеріалу щодо тканин і клітин.**

**8**

**Вперше продемонстровано здатність АВ до проникнення в тканини та розширено**

**дані щодо здатності АНЧ проникати у внутрішньоклітинні структури.**

**Встановлено відсутність тропності вуглецевих наночасточок до певних**

**органів чи структур.**

**Розширено розуміння механізмів патологічних процесів, спричинених**

**карбоновими часточками в організмі. Вперше встановлено ушкоджуючу дію сажі**

**щодо кровоносної системи зародка. Підтверджено і розширено дані щодо**

**спричинення АНЧ оксидативного стресу в клітинах. Продемонстровано тяжкий**

**тератогенний ефект ТРГ.**

**Практичне значення. Продемонстровано необхідність дотримання заходів**

**безпеки для довкілля та особистого захисту на виробництвах, пов’язаних з**

**технічним вугіллям, алмазними наночасточками та терморозширеним графітом у**

**зв’язку з їх здатністю проникати до кровоносного русла, мігрувати в організмі та**

**викликати порушення структури і роботи органів.**

**Розширення інформаційних даних щодо перебігу ембріогенезу у птахів**

**надає можливість їх використання в учбовому процесі для розробки посібників,**

**підготовки лекційних та семінарських занять з гістології та біології розвитку.**

**Одержані морфологічні підтвердження присутності нанорозмірних вуглецевих**

**матеріалів в тканинах і клітинах зародків можна використовувати в якості**

**критерію верифікації цих частинок на гістологічних препаратах.**

**Використання курячих ембріонів в дослідженні демонструє широкі**

**можливості застосування цього об’єкта в якості тестової системи для оцінки**

**патологічної дії різноманітних біологічних (віруси, бактерії) та абіогенних**

**факторів на цілісний організм.**

**Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто проведено аналіз**

**профільної наукової літератури та обґрунтування методології проведення**

**експерименту. Самостійно було здійснено збір макроскопічних та**

**морфометричних даних, що характеризують ембріональний розвиток та**

**проведено їх статистичний аналіз. Здобувач брав участь у всіх етапах**

**виготовлення препаратів для світлооптичного та ультраструктурного**

**9**

**дослідження. Дисертантом було проведено дослідження та опис всіх одержаних**

**препаратів. Самостійно здійснено аналіз одержаних даних, написані і**

**проілюстровані всі розділи дисертації та її висновки.**

**Комплексне лабораторне забезпечення досліджень здійснено на кафедрі**

**гістології та ембріології НМУ імені О.О. Богомольця. Консультування щодо**

**виготовлення препаратів для світлової та трансмісійної мікроскопії здійснювали**

**старші лаборанти Гребенщикова Н.О. та Вішнєвська Н.В. Професором Терещенко**

**В.П. визначено актуальність наукового пошуку, мету й завдання роботи,**

**розроблено методологію дослідження, професором Чайковським Ю.Б. проведено**

**наукове консультування кожного етапу виконання дисертації. Всі дані, отримані у**

**співавторстві, відображені у спільних публікаціях.**

**Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації**

**доповідались та обговорювались на конференції молодих науковців Інституту**

**сорбції та проблем ендоекології НАН України (Київ, 2009), ІХ науковій**

**конференції студентів та молодих науковців в Україні (Київ, 2009), науковопрактичній конференції «YouthNanoBioTech-2010. Молодіжний форум з**

**нанотехнологій» (Київ, 2010), науково-практичній конференції «Актуальні**

**питання сучасної патоморфології» (Київ, 2012), ІХ конгресі патологів України**

**«Актуальні проблеми патології» (Луганськ, 2013).**

**Публікації. За темою дисертації опубліковано 10 наукових праць, з яких 5**

**наукових статей у фахових виданнях, що відповідають вимогам МОН України, з**

**яких 2 у наукових виданнях інших держав, що індексуються міжнародними**

**наукометричними базами; а також одна стаття в збірнику наукових праць; одна**

**стаття в періодичному (медичному) виданні; 3 тез доповідей у матеріалах**

**наукових конференцій та конгресах.**

**Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду**

**літератури, методів досліджень, 3-х розділів результатів власних досліджень,**

**розділу, присвяченому аналізу й узагальненню результатів, висновків та списку**

**використаних джерел, який складається з 118 найменувань. Матеріали**

**дисертаційної роботи викладені на 150 сторінках (з яких основна частина займає**

**10**

**139 сторінок, ілюстрована 8 таблицями, 18 рисунками, з них 6 діаграм, 55**

**мікрофотографіями та 75 електронограмами.**

ВИСНОВКИ

Вирішенаактуальнанауковазадачащополягаєувизначеннівпливу

вуглецевихматеріаліврізноїдисперсностінаорганізмщорозвиваєтьсяз

оцінкоюпроникноїздатностіітропностідотканинНаосновіданихвласних

експериментальнихдослідженьвиявленоособливостірозповсюдженнярізних

досліджуванихматеріалівворганізмізародкатаспецифікуушкоджуючоїдії

кожногознихОдержаніданіможутьбутивподальшомузадіяніврозробці

концепціїзоцінкибезпечностівуглецевихматеріаліврізноїдисперсності

Технічневугіллясажаалмазнінаночасточкитатерморозширений

графітнегативновпливалинаперебігембріогенезупідвищувавсярівень

смертностізвконтрольнійгрупідоугрупіізвведеним

терморозширенимграфітомприцьомублизькіміжсобоюзначенняданого

показникаспостерігалисядляекспериментальнихгрупізвведеннямсажіі

алмазнихнаночасточоктавідповіднопорушувавсякровообігу

стінціжовтковогомішкадостовірновищийвідносноконтрольноїгрупирівень

запустіннясудинуцихекспериментальнихгрупахзменшувалисярозміритіла

зародківтамаленькихзародківугрупахізтехнічним

вугіллямалмазниминаночасточкамиітерморозширенимграфітомвідповідно

приуконтрольнійгрупі

Результатипроведенихсвітлооптичнихтаультраструктурнихдосліджень

курячихембріонівпротягомвсьогоперіодуембріогенезунатканинномуі

клітинномурівняхневиявилипатологічноговпливуактивованоговугілляна

зародки

Світлооптичнітаультраструктурнідослідженнясвідчилипронегативний

впливтехнічноговугіллявпершучергунакровоноснусистемузародка

ушкодженнястінкисудинагрегаціяеритроцитівпорушеннямікроциркуляції

органів



Електронномікроскопічнідослідженняпоказализдатністьалмазних

наночасточокдопроникненнявклітинищосупроводжувалосьвраженням

мітохондрійіпорушеннямїхструктури

Світлооптичнітаультраструктурнідослідженнявстановилипотужну

ушкоджуючидіютерморозширеногографітущодопровізорнихорганівтатіла

зародкаНаявністьпікнозуірексисуядермутнацитоплазманечіткімежіта

деформаціяклітиноболоноктатілаембріонавженаранніхетапахембріогенезу

вказувалинанекротичнізміниспричиненівведеннямцьогоматеріалуна

пізнішихстадіяхтканиниперетворювалисьнаклітиннийдетритВведенняцього

матеріалупризвелодонесуміснихзподальшимрозвиткомнаслідківушкодження

судинстінкижовтковогомішкаприлеглихтканинзародкамеханічного

руйнуванняоболоноктаорганелклітинщонапрямуконтактувализчасточками

таагрегатамицьогоматеріалу

Активованевугіллятехнічневугіллятаалмазнінаночасточкибулиздатні

доміграціїорганізмомзтокомкровіГостреураженнякровоносноїсистеми

зародківпривведенніїмтерморозширеногографітунедаломожливостіоцінити

цейшляхпоширенняВстановленонайнижчусередіншихвуглецевихчасточок

проникнуздатністьтехнічноговугіллятанайвищу–дляалмазнихнаночасточок

Виразніпорушенняплазматичноїмембранитаклітиннихорганелвключноз

двомембранними–мітохондрійтаядерпідвпливомалмазнихнаночасточок

опосередкованопідтверджувалоїхприсутністьвклітинахнетількизародкових

оболонокайсамогоембріона

Виявленіпатологічнізмінивтканинахкурячихембріонівякізазналидії

технічноговугілляалмазнихнаночасточоктатерморозширеногографіту

засвідчуютьможливістьїхньоготератогенноговпливунаживіорганізми