

Оценка эмбриотоксического влияния нано- и микродисперсной серы

Л. А. Шарафутдинова*, А. Р. Юсупов, И. А. Массалимов,
З. Р. Хисматуллина, С. А. Башкатов

*Башкирский государственный университет
Россия, г. Уфа, 450076, улица Заки Валиди, 32.*

**Email: sharafla@yandex.ru*

Представлены результаты экспериментального изучения эмбриотоксического действия нано- и микродисперсной серы (50 мг/кг). Показано, что введение микродисперсной серы беременным самкам повышает уровень предимплантационной смертности, а также негативно влияет на массу эмбрионов.

Ключевые слова: сера, наноматериалы, эмбриотоксичность.

В последние годы поражение кожи и ее придатков грибковой инфекцией стремительно растет и остается одной из наиболее важных проблем дерматологии [1]. Актуальность проблемы микозов обусловлена не только их высокой распространенностью среди населения разных стран, но и постоянным ростом заболеваемости микотической инфекцией в мире [2]. При этом онихомикоз (грибковое поражение ногтей) регистрируется более чем в три раза чаще, чем дерматофитии других локализаций [3, 4]. По данным проекта «Горячая линия», проведенного Национальной академией микологии РФ, две трети от всех обратившихся по поводу онихомикоза составляли женщины [5, 6].

В настоящее время у микологов имеется широкий выбор противогрибковых препаратов системного и наружного действия в различных лекарственных формах. Однако проблема лечения больных онихомикозом по-прежнему остается актуальной в связи с распространением грибковых болезней, длительным и часто хроническим их течением, недостаточной эффективностью и отрицательными побочными реакциями существующих антимикотиков и в частности противогрибковых препаратов местного применения [8]. Эти причины, а также возникновение резистивности возбудителей к существующим антимикотикам делает актуальным поиск новых веществ, оказывающих фунгицидное действие и не обладающих выраженной токсичностью, в том числе и эмбриотоксичностью [9, 10].

В состав средств наружной терапии при лечении дерматофитий, кожных форм оппортунистических микозов и алергодерматозов входит сера, микробиоцидные, в том числе и фунгицидные свойства которой достаточно хорошо известны [11, 12]. Показано, что антифунгальные свойства нанопрепаратов серы превосходят таковые препара-

тов микронизированной серы в 3–9 раз [13, 14]. Как и для многих других перспективных лекарственных средств, в настоящее время актуально проведение исследований, направленных на повышение эффективности препаратов на основе высокодисперсной серы, в том числе и проведение исследований биологических свойств наночастиц серы. Интересным представляется сравнение биологического воздействия наночастиц серы и частиц серы микронных размеров, обычно используемых в хорошо известных серных мазях.

Цель данного исследования – оценка возможного эмбриотоксического действия нано- и микродисперсной форм серы.

Методы исследования

В исследованиях использована микронная и наноразмерная формы серы. Микронная форма серы была получена путем измельчения в роликовой мельнице, наноразмерная – путем осаждения из раствора полисульфида натрия [15]. Распределение частиц по размерам порошка серы определяли на анализаторе размеров частиц Shimadzu SALD–7101. Средний размер частиц измельченной в роликовой мельнице микронной формы серы составил 8 мкм, а средний размер наночастиц серы, полученных химическим осаждением – 25 нм.

Опыты по изучению эмбриональной токсичности были проведены на 60 самках нелинейных белых крыс массой 170–210 г в соответствии с требованиями Научного центра экспертизы средств медицинского применения [16].

В первой серии опытов изучена эмбриональная токсичность нано- и микронной форм серы, регистрируемая в антенатальном периоде развития. С этой целью было сформировано три группы самок: контроль (n=20), опыт 1 (n=20), пероральное введение наноразмерной серы в дозе 50 мг/кг веса животного, опыт 2 (n=20, пероральное введение микронной формы серы в дозе 50 мг/кг массы тела). В течение двух эстральных циклов просматривали вагинальные мазки. Отмечали стадии проэструс, эструс, диэструс и метаэструс. Вечером подсаживали самцов из расчета 2 самца на 3 самки. Обнаружение в вагинальных мазках сперматозоидов считали первым днем беременности. Ежедневно с 1-го по 19-й день беременности крысам экспериментальных групп перорально вводили изучаемые соединения. На 20-й день беременности половине крыс из каждой группы проводили эвтаназию животных с последующим патологоанатомическим исследованием организма крыс и плодов. Вскрывали брюшную полость, вырезали матку и в чашке Петри с физиологическим раствором, вскрыв рога, подсчитывали количество живых, мертвых, резорбированных плодов, состояние плаценты и эндометрия, отмечая места имплантации. В яичниках подсчитывали количество желтых тел. Плоды подвергали наружному осмотру, взвешиванию, определяли краниокаудальный размер (длину тела), пол плода. Устанавливали пред- и постимплантацион-

ную смертность эмбрионов, которые являлись показателем эмбриолетального действия исследуемых веществ. Для определения предимплантационной смертности находили разницу между количеством желтых тел и количеством мест имплантаций и вычисляли, какую долю в процентах составила эта цифра от числа желтых тел. Для определения постимплантационной смертности вычисляли разность между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов и, вычисляли, какую долю в процентах составила эта цифра от числа имплантаций. Для вычисления общей эмбриональной смертности находили разность между числом желтых тел беременности и количеством живых плодов и, определяли какую долю в процентах составила эта цифра от числа желтых тел беременности. После оценки жизнеспособности плодов, определения их массы, проводили анализ внешних аномалий (подкожные кровоизлияния, отек подкожной клетчатки) и пороков развития.

Математико-статистическую обработку данных производили с использованием лицензионного пакета прикладных программ «STATISTICA» v.7.0 (StatSoft Inc., США). В модуле «Основные статистики» («Basic Statistics») по всем изученным количественным показателям были подсчитаны следующие основные характеристики: выборочное среднее (среднее арифметическое, Mean), стандартную ошибку среднего (Standard Error of Mean) и стандартное отклонение (Standard Deviation). Для всех выборок проводили анализ соответствия вида распределения количественных признаков закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W test). Поскольку распределение признаков в группах являлось нормальным, сравнительный анализ групп проводился с помощью параметрических методов (t-критерий Стьюдента). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Количественные данные в таблице представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – стандартная ошибка средней и $M \pm Sd$, где M – выборочное среднее, Sd – стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования эмбриофетотоксического действия нано- и микронной формы серы, регистрируемого в антенатальном периоде развития установлено, что клиническое состояние самок крыс опытных групп при ежедневном пероральном введении крысам в период беременности не отличалось от состояния животных контрольной группы. Все животные поедали корм, адекватно реагировали на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители. Состояние кожного покрова и слизистых оболочек крыс из опытной группы визуально не отличалось от таковых в контроле.

Нормальное течение беременности контрольной и опытных групп животных подтверждалось еженедельным взвешиванием, взятием влагалищных мазков на 9-е и 10-е сутки беременности. На момент вскрытия все плоды во всех группах были живы. Про-

должительность беременности, количество живых плодов, кранио – каудальный размер, количество желтых тел, мест имплантации у беременных крыс при ежедневном пероральном введении нано- и микродисперсной серы не отличались от соответствующих показателей животных контрольной группы. В результате проведенных исследований было показано, что введение обеих форм серы не влияет на общее состояние, поведение и динамику массы тела беременных крыс (табл. 1).

Таблица 1. Динамика массы тела беременных крыс (+% к исходной)

Группы животных	n	1 неделя M ± Std.Dev.	2 неделя M ± Std.Dev.	3 неделя M ± Std.Dev.
Контроль, %	10	9.18 ± 2.79	14.75 ± 2.04	32.62 ± 2.35
Опыт 1, наноразмерная форма серы, %	10	10.86 ± 2.65	15.03 ± 2.02	34.11 ± 3.57
Опыт 2, микронная форма серы, %	10	11.29 ± 2.09	13.49 ± 2.29	31.20 ± 2.68

Предимплантационная гибель в группе крыс, которым перорально вводили нанодисперсную серу составила 2.91%. В группе крыс, которым перорально вводили микронную форму серы этот показатель был выше, чем в контрольной группе (3.66%) и составил 11.77% ($p < 0.05$; табл. 2). Постимплантационная гибель эмбрионов в группах не была выявлена.

Установлено, что пероральное введение микронной формы серы негативно влияет на средний вес эмбрионов, который составил 2.17 ± 0.04 г, тогда как в контрольной группе крыс и крыс, получающих наноформу серы – 2.60 ± 0.08 г и 2.64 ± 0.06 г соответственно ($p < 0.05$).

Таким образом, изучение эмбриотоксического действия нанодисперсной и микродисперсной серы показало, что микродисперсная сера в испытанной дозе при пероральном поступлении беременным крысам с 1-й по 19-й дни беременности отрицательно влияет на средний вес эмбрионов, повышает показатели предимплантационной и общей эмбриональной смертности, в то время как нанодисперсная сера не вызывает подобных эффектов.

Выводы

Изучение эмбриотоксического действия нано- и микродисперсной серы показало, что микродисперсная сера в изученной дозе при пероральном поступлении беременным крысам с 1-го по 19-й день беременности повышает показатель предимплантацион-

ной смертности и негативно влияет на массу эмбрионов, в то время как нанодисперсная сера не вызывала подобных эффектов.

Таблица 2. Показатели эмбриотоксического действия нано- и микродисперсной серы при пероральном введении крысам с 1 по 19 день беременности

Исследуемые показатели	Группы животных		
	Контроль	Опыт 1, наноразмерная форма серы	Опыт 2, микронная форма серы
	M ± Std.Dev.	M ± Std.Dev.	M ± Std.Dev.
Количество желтых тел на 1 крысу, шт	7.00 ± 1.69	8.00 ± 1.15	8.00 ± 1.24
Количество мест имплантации на 1 крысу, шт	6.80 ± 1.93	7.80 ± 1.39	7.00 ± 1.05
Количество эмбрионов на 1 крысу, шт	6.80 ± 1.93	7.80 ± 1.39	7.00 ± 1.05
Предимплантационная смертность, %	3.66 ± 7.76	2.91 ± 6.22	11.77 ± 10.57*
Постимплантационная смертность, %	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Общая эмбриональная смертность, %	3.66 ± 7.76	2.91 ± 6.22	11.77 ± 10.57*
Кранио-каудальный размер плода, см	3.05 ± 0.07	3.09 ± 0.09	3.08 ± 0.09
Масса плода, г	2.60 ± 0.08	2.64 ± 0.06	2.17 ± 0.04*

Примечание: *- статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$).

Таким образом, представляется перспективной дальнейшая разработка эффективных антимикотических средств, в состав которых входила бы наноразмерная сера. Полученные данные согласуются с общей концепцией применения наночастиц в современных технологиях, в которых использование дисперсных веществ в наноразмерном диапазоне изменяет их биологические свойства. Полученные результаты могут быть учтены при разработке норм содержания наноматериалов в серосодержащих лекарственных препаратах.

Литература

1. Иванова М. А., Огрызенко Е. В., Бендриковачкая И. А. / Клиническая дерматология и венерология. 2009. №2. С. 26–31
2. Соколова Т. В. Малярчук А. П., Малярчук Т. А. / Клиническая дерматология и венерология. 2011. №4. С. 27–31.
3. Васенова В. Ю., Бутов Ю. С. / Рос. журн. кожн. и вен. бол. 2005. №3. С. 42–44.
4. Дубенский В. В. / Клиническая дерматология и венерология. 2004. №3. С. 11–15.
5. Соколова Т. В., Малярчук Т. А., Газарян О. Л. / РМЖ. 2014. №8. С. 571.
6. Сергеев Ю. В. Шпигель Б. И., Сергеев А. Ю. Фармакотерапия микозов. М.: Медицина для всех. 2003. 200 с..
7. Лещенко В. М. Современные антимикотики в дерматологии / Consilium Medicum. 2004. S. 186–191.
8. Таха Т. В., Нажмутдинова Д. К. / РМЖ. 2012. №22. С. 1150.
9. Юсупов А. Р., Шарафутдинова Л. А., Чикишева Г. Е., Башкатов С. А. Биофармацевтический журнал. 2015. Т. 7. №6. С. 49–52.
10. Гуськова Т. А. / Фарматека. 2006. №5. С. 151- 156.
11. Новоселов В. С., Новоселов А. В. Рациональные подходы к терапии поверхностных микозов // Consilium Medicum, приложение «Дерматология». 2007. №1. С. 24–27.
12. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М: «Новая волна». 2002. Т.2. 608 с.
13. Massalimov I. A., Medvedev U. A., Zaynitdinova R. M. / J Nanotechnol Nanosci. 2012
14. Массалимов И. А, Зайнитдинова Р. М., Медведев Ю. А., Мухамадеева О. Р., Мусавирова Л. Р. / Успехи медицинской микологии. 2014. Т. 12. С. 419–420.
15. Массалимов И. А. / Журнал прикладной химии. 2008. Т. 81. №2. С. 195–199.
16. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. Под ред. Миронова А. Н. – М.: Гриф и К. 2012. 944 с.

Статья рекомендована к печати кафедрой физиологии человека и зоологии биологического факультета БашГУ (докт. биол. наук, проф. З. Р. Хисматуллина)

Evaluation of sulfurs nanoparticles and microparticles embryotoxic effects

L. A. Sharafutdinova*, A. R. Yusupov, I. A. Massalimov,
Z. R. Khismatullina, S. A. Bashkatov

Bashkir State University

32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Russia.

**Email: sharafla@yandex.ru*

The results of experimental study of the embriotoxic action of nanoparticles and microparticles of sulfur (50 mg/kg). Upon entering the microdispersible sulfur for pregnant women increases the level of pre-implantation mortality, and negatively affects the mass of the embryos.

Keywords: sulfur, nanomaterials, embryotoxicity.