

УДК 61:577.1

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИМЫШЕЧНОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ МЕДИ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ САМОК КРЫС ПРИ ГЕСТАЦИИ

Слободсков А.А.

ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, Россия (460000, Оренбург, пр. Победы, 13, кв. 307), e-mail: andreislobodskov@mail.ru»

Рассмотрено влияние внутримышечного введения наночастиц меди на биохимические показатели крови самок крыс при беременности. Определены цели исследования, заключающиеся в оценке влияния наноразмерных частиц на состояние метаболических процессов в организме крыс в период беременности по биохимическим показателям крови. Исследования выполнены на 40 белых лабораторных крысах линии «Wistar» при гестации. В основной части изложены результаты проведенного эксперимента. Было установлено, что максимальная концентрация наночастиц привела к прерыванию беременности на ранних сроках. При введении наночастиц в концентрации 0,5 и 1 мг/кг беременность пролонгировалась. На 20-й день беременности плоды были жизнеспособны без видимых пороков развития. Во всех опытных группах происходило снижение в сыворотки крови общего белка, билирубина. Наибольшее снижение отмечено при введении меди в концентрации 2 мг/кг (общий белок снижен в 1,5 раза, билирубин в 2,5 раза). В этой же группе выявлено значительное снижение уровня триглицеридов и холестерина. Холестерин снижен в 2 раза, а уровень триглицеридов в 8 раз по сравнению с контролем. Во второй и третьей опытных группах в 3 раза повышен уровень амилазы, указывающий на повреждение ткани поджелудочной железы. В заключении говорится, что максимальная концентрация меди приводит к прерыванию беременности, оказывает наиболее выраженное биологическое действие на функциональное состояние печени.

Ключевые слова: наночастицы меди, беременность, биохимические показатели крови.

INFLUENCE OF INTRAMUSCULAR INTRODUCTION OF NANODIMENSIONAL PARTICLES OF COPPER ON BIOCHEMICAL INDICATORS OF BLOOD OF FEMALES OF RATS AT GESTATION

Slobodskov A.A.

ФГБОУ ВПО «Оренбургский Государственный университет», г.Оренбург, Россия, (460018, Оренбург, проспект Победы, 13), e-mail: andreislobodskov@mail.ru

The influence of intramuscular introduction of nanoparticles of copper on biochemical indicators of blood of females of rats at pregnancy is regarded. The purposes of research are determined. They are as follows: assessment of influence of nanodimensional particles on metabolic processes in rats' organism during pregnancy due to biochemical blood indicators. Researches are executed on 40 white laboratory rats of the "Wistar" line at a gestation. Results of the made experiment are stated. It was established that the maximum concentration of nanoparticles led to pregnancy interruption on early terms. At introduction of nanoparticles in concentration 0,5 and 1 mg/kg pregnancy was prolonged. For the 20-th day of pregnancy fetus was viable without visible developmental anomalies. In all skilled groups there was a decrease in general protein, bilirubin in serums of blood. The greatest decrease is noted at copper introduction in concentration 2 mg/kg (the general protein is lowered by 1,5 times, bilirubin – by 2,5 times). Considerable decrease in level of triglycerides and cholesterol is revealed in the same group. Cholesterol is lowered twice, and level of triglycerides – by 8 times in comparison with the control. In the second and third skilled groups the level of amylase indicating damage of tissue of a pancreas is 3 times raised. In the conclusion it is said that the maximum concentration of copper leads to pregnancy interruption, has the most expressed biological effect on a functional condition of a liver.

Keywords: copper nanoparticles, pregnancy, biochemical indicators of blood.

Введение

В настоящее время нанотехнологии являются одним из важнейших направлений технологического развития во многих странах. Наноматериалы и изделия из них стали

применять в различных областях науки и техники: от авиации до микро- и нанoeлектроники, от биотехнологии до геномной инженерии [3]. Интерес к наночастицам вызван высокой степенью измельчения, при которой существенно изменяются физико-химические свойства (механические, электропроводные, каталитические, биологические и др.) практически всех химических веществ. Кроме того, размеры наночастицы и свойства их поверхностей позволяют им вступать в прямой контакт на молекулярном уровне с биологическими тканями и системами, с инфекционными агентами, эндотоксинами, токсинами, в том числе микотоксинами, а также с различными химическими соединениями органической и неорганической природы (протеинами, липидами, нуклеиновыми кислотами) и отдельными структурами клеток [1, 2, 5, 7, 9–21]. Быстрое развитие нанотехнологий сопровождается повышением уровня воздействия наночастиц на биообъекты, при этом информации об их потенциальной опасности для здоровья недостаточно [6]. В доступной нам литературе отсутствует информация о влиянии наноразмерных частиц на состояние метаболических процессов в организме крыс в период беременности по биохимическим показателям крови, что и стало целью нашего исследования.

Материалы и методы исследования

Исследования выполнены в условиях экспериментально-биологической клиники (вивария) Оренбургского государственного университета на белых лабораторных крысах линии «Wistar» при гестации. Контрольные и экспериментальные группы формировались из шестимесячных самок массой 250–300 г ($n = 40$). Крысы находились в стандартных условиях с естественной сменой освещения и полноценным рационом питания. У всех животных был свободный доступ к пище и воде. В работе использовали высокодисперсный нанопорошок меди. Наночастицы меди типа Cu10x представляют собой сферические частицы размером $103,0 \pm 2,0$ нм с оксидной пленкой толщиной 6 нм, полученные в Институте энергетических проблем химической физики РАН (Москва). Методом рентгенофазового анализа определен их состав: меди кристаллической – 96%, меди оксида – 4%. Эксперимент включал в себя два последовательных периода: 1 – уравнивающий (продолжительность – 14 сут.), 2 – учетный (продолжительность – 20 сут.). В ходе первого периода проводили формирование максимально однородных групп. В ходе учетного периода животные были разделены на четыре группы. Первая экспериментальная группа получала нанопорошок меди из расчета 2 мг/кг; вторая группа – 1 мг/кг; третья группа – 0,5 мг/кг. Четвертая группа являлась контрольной, животным внутримышечно вводили физиологический раствор в количестве 0,2 мл. Выбранные концентрации наночастиц меди не превышали максимально переносимых доз для данного металла. Раствор наночастиц вводили самкам с ранних сроков беременности внутримышечно в бедренную группу мышц с соблюдением правил

асептики и антисептики с интервалом 3 дня в количестве 6 инъекций. Для приготовления взвеси наночастиц меди использовали ультразвуковую ванну. По окончании эксперимента производили забор крови. Забой животных проводили под небуталовым наркозом на 19–20-й день беременности. Экспериментальная часть работы была выполнена в соответствии с протоколами Женевской конвенции и принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434–2009; Карпищенко Н.Н., 2010).

Определение биохимических показателей крови проводили с помощью полуавтоматического биохимического анализатора «Climaplus». Для работы на анализаторе использовали стандартные наборы реактивов.

В сыворотке крови определяли следующие показатели: общий белок (биуретовым методом); альбумины (по реакции с бром крезоловым зеленым); глюкозу (глюкозооксидазным методом); общий билирубин (по реакции с диазотированной сульфаниловой кислотой); креатинин (по реакции Яффе); мочевины (уреазным глутамат дегидрогеназным методом); мочевую кислоту (фосфорно-вольфрамовым методом); общий холестерин (холестерол оксидазным методом); триглицериды (ферментативным методом); активность ферментов (кинетическим методом).

Данные эксперимента обрабатывали статистически с использованием программ Excel, Statistica 5.

Результаты и их обсуждение

В ходе эксперимента беременность животных первой группы прервалась после введения второй дозы препарата, тем не менее, им было продолжено введение наночастиц. У крыс второй и третьей опытных групп течение беременности не отличалось от самок контрольной группы. У животных отсутствовали изменения в поведенческих реакциях, во внешних признаках (волосыном покрове, видимых слизистых). Крысы адекватно прибавляли в массе. На 20-й день беременности все плоды были жизнеспособны, без видимых пороков развития, соответствовали сроку гестации.

Из таблицы видно, что под влиянием наночастиц, введенных животным внутримышечно, происходило статистически достоверное снижение концентрации общего белка в сыворотке крови во всех опытных группах. Наиболее выраженный биологический эффект в отношении белкового обмена оказывали наночастицы меди в концентрации 2 мг/кг. Подтверждением влияния наночастиц на белоксинтезирующую функцию печени является снижение в опытных группах сывороточного альбумина, синтез которого происходит главным образом в печени.

Функциональную активность печени также характеризуют такие показатели, как уровень в плазме крови общего билирубина, аминотрансфераз (ЩФ, АлАт, АсАт). Самые низкие значения билирубина были зафиксированы в первой группе (более чем в 2 раза). Во второй и третьей опытных группах также имелось достоверное снижение уровня общего билирубина по сравнению с контрольной группой.

Изменение биохимических показателей сыворотки крови самок беременных крыс под влиянием наночастиц меди.

Показатель крови	1-я опытная	2-я опытная	3-я опытная	Контроль
Общий белок	62,1±0,5*	77,8±3,5*	77,7±1,5*	86,7±1,8
Альбумины	32,1±0,3*	32,2±0,3*	32,0±0,4*	46,7±0,9
Глюкоза	7,7±0,2*	8,5±0,1	7,1±0,5*	8,6±0,3
Билирубин	1,4±0,2*	2,1±0,1*	2,3±0,1*	3,6±0,2
Мочевина	7,8±0,3*	12,0±0,4	13,4±1,4	11,3±1,3
Мочевая кислота	120,7±9,1	595,8±19,3*	531,7±35,3*	129,3±3,5
Креатинин	68,9±1,3*	100,0±0,0	110,0±0,0	105,3±6,5
Триглицериды	0,6±0,1*	4,1±0,4	2,0±0,3*	4,8±0,9
Холестерин	1,3±0,1*	2,4±0,1	2,5±0,1	2,7±0,1
АлАт	82,3±3,5	77,7±13,2	67,3±10,0	72,7±5,5
АсАт	260,4±13,6*	565,8±25,6*	389,7±28,6*	101,0±8,4
ЩФ	552,6±30,1*	83,3±5,7	82,8±13,0*	70,0±1,2
Амилаза	487,57±15,6*	1478,7±35,8*	1491,2±98,0*	591,7±17,8

* Статистически достоверные отличия ($p \leq 0,05$).

Аланин – и аспаратаминотрансфераза синтезируются внутриклеточно в печени и попадают в кровь в результате цитолиза при ее повреждениях. Хотя отсутствует изменение уровня АлАт, снижение билирубина, достоверное повышение уровня аспаратаминотрансферазы и щелочной фосфатазы у крыс, получавших наночастицы меди, по сравнению с контрольной группой, свидетельствуют о наличии повреждений печеночной ткани. Мочевина крови, являясь конечным продуктом распада белков, позволяет судить о работе почек. Показатель креатинина, продукта почечного обмена белков, определяется с мочевиной и отражает функцию гломерулярного аппарата почек. Достоверных изменений этих показателей в условиях нашего эксперимента во второй и третьей опытных группах выявлено не было, что свидетельствует об отсутствии патологических процессов в почках крыс. Однако выявлено значительное увеличение уровня мочевой кислоты в этих группах.

Изолированный рост данного показателя в отсутствии роста мочевины и креатинина, возможно, связан с наличием беременности у крыс этих групп. Это предположение подтверждается низким уровнем мочевой кислоты в первой опытной группе, где беременность прервалась на ранних сроках. Обращает на себя внимание достоверное снижение креатинина и мочевины у самок первой опытной группы, что подтверждает повреждение ткани печени, так как синтез мочевины происходит в гепатоцитах. При оценке показателей холестерина и триглицеридов, характеризующих липидный обмен в организме, получены следующие данные. Достоверных изменений уровня холестерина между контрольной, второй и третьей опытными группами выявлено не было. Отмечено достоверное снижение триглицеридов в третьей опытной группе в сравнении с контролем более чем в два раза. Наибольшее снижение уровня триглицеридов и холестерина наблюдалось при введении максимальных концентраций меди (первая группа). Холестерин в этой группе снижен в 2 раза, а уровень триглицеридов в 8 раз по сравнению с контролем. При оценке показателей углеводного обмена выявлено, что уровень сахара крови снижен во всех опытных группах. Значительное снижение наблюдалось в первой и третьей экспериментальных группах. Гипогликемия, наблюдаемая при тяжелых заболеваниях печени, указывает на ее повреждение. Механизмы развития гепатогенной гипогликемии обусловлены нарушениями целого ряда метаболических путей превращения углеводов в печени. Одним из ферментов, принимающих участие в углеводном обмене, является амилаза крови. Вырабатываясь в поджелудочной железе, она характеризует ее морфофункциональное состояние. Выявлено достоверное повышение амилазы во второй и третьей группах (практически в 3 раза), что указывает на повреждение ткани поджелудочной железы у этих крыс.

Заключение

Таким образом, максимальная концентрация наночастиц меди при внутримышечном введении привела к прерыванию беременности на ранних сроках. При введении меди в концентрации 0,5 и 1 мг/кг соответственно беременность пролонгировалась, ее течение не отличалось от крыс контрольной группы и плоды на 20-й день беременности были жизнеспособны, без видимых пороков развития, соответствовали сроку гестации. Наночастицы меди при парентеральном введении в большей степени оказывали влияние на функциональное состояние печени (страдает белковый, углеводный, жировой обмен). При этом наиболее выраженное биологическое действие наночастиц выявлено у крыс, получавших максимальную концентрацию меди.

Список литературы

1. Дуднев А.Д. Токсикология наночастиц // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 145. – № 3. – С. 78–80.
2. К разработке критериев безопасности наночастиц металлов при введении их в организм животных / Е.А. Сизова [и др.] // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2011. – № 1. – С. 40–42.
3. Нотова С.В., Дускаева А.Х., Мирошников С.В. Оценка влияния стресса на психофизические и метаболические показатели // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – №10 (146). – С. 54–57.
4. Мирошников С.В., Нотова С.В., Кван О.В. Особенности адаптационных реакций у лиц с высоко и низконормальным уровнем тиреотропного гормона, проживающих на территории эндемичной по зобу // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2011. – №12(131). – С. 293–296.
5. Омельченко А.И. Биофункциональные наночастицы в лазерной медицине // Вестник Югорского государственного университета. – 2011. – Вып. 2 (21). – С. 40–50.
6. Показатели адаптивности к физической нагрузке лабораторных животных в условиях экспериментального изменения тиреоидного статуса / С.В. Мирошников [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – №10–1. – С. 73–77.
7. Проданчук Н.Г., Балан Г.М. Нанотоксикология: состояние и перспективы исследований // Современные проблемы токсикологии. – 2009. – № 3-4. – С.4–20.
8. Фостер Л. Нанотехнологии. Наука, инновации и возможности / пер. с англ. – М.: Техносфера, 2008. – 350 с.
9. Dutta D., Sundaram S.K., Teeguarden, Riley B.J. Adsorbed proteins influence biological activity and molecular targeting of nanomaterials // Toxicol. Sci. 2007. 100 (1). P. 303–15.
10. Elder A.C.P., Gelein R., Azadniv M., Frampton M. Systemic interactions between inhaled ultrafine particles and endotoxin // Ann OccupHyg. 2002 (Suppl 1). P. 231–234.
11. Gras S.L., Squires A.M., Dobson C.M. Functionalized amyloid fibrils for bionanotechnology // Australian Research Council Nanotechnology Network International Conference on Nanoscience and Nanotechnology; 2006 Jul 3-7; Brisbane, Australia.
12. Kagan V.E., Bayir H., Shvedova A.A. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin // Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine. 2005. Vol. 1. P. 313–316.
13. Kabanov A.V. Polymer genomics: an insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines // Adv. Drug Deliv. Rev. 2006. 58 (15). P. 1597–1621.

14. Lynch I., Cedervall T., Lundqvist M. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids surface science challenge for the 21-st century // *Adv Colloid Interface Sci.* 2007. 31. P. 167–74.
15. Nighswonger G. A Medical Device Link MD & DI column: New polymers and nanotubes add muscle to prosthetic limbs [on line]. Available From URL: <http://www.devicelink.com/mddi/archive/99/08/004.html> [Assessed 2006 Jan 25].
16. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles // *Environmental Health Perspectives.* 2005. 7 (13). P. 823–839.
17. Oberdorster G. Systemic effects of inhaled ultrafine particles in two compromised, aged rat strains // *InhalToxicol.* 2004. 16 (6/7). P. 461–471.
18. Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery / I. Roy *et al.* // *ProcNatlAcadSci USA.* 2005. 102. P. 279–284.
19. Powers Kevin W. Characterization nanoscale particles for toxicological evaluation / Kevin W. Powers, Scott Brown // *Toxicol. Science.* 2006. 90. No. 2. P. 296–303.
20. Processing and in vitro assembly of virus-like-particles / D.L. Lipin *et al.* // Australian Research Council Nanotechnology Network International Conference on Nanoscience and Nanotechnology; 2006 Jul 37; Brisbane. Australia.
21. Tsuji Joyce S., Maynard Andrew D. Risk assessment of nanoparticles // *Toxicol. Science* [КЭ]. 2006. 89. No. 1. P. 42–50.

Рецензенты:

Мирошников С.А., д.м.н., профессор, ФГБОУ ВПО «Оренбургский Государственный университет», г.Оренбург.

Лебедев С.В., д.б.н., ФГБОУ ВПО «Оренбургский Государственный университет», г.Оренбург.