ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ И ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.9, 614.7

ЭФФЕКТЫ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ЭКСПОЗИЦИИ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МАРГАНЦА НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ НЕРВНУЮ СИСТЕМУ, ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И ФЕРМЕНТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС

Н.В. Зайцева[1], М.А. Землянова[1], В.Н. Звездин[1], Т.И. Акафьева[2], Д.Л. Мазунина[2], А.А. Довбыш[1]

[1] ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»,
Россия, 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82,
[2] ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»,
Россия, 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

Нанодисперсные частицы оксида марганца (MnO) в силу высокой реакционной способности широко используются в качестве активной субстанции при производстве сорбентов и катализаторов, используемых в технологиях утилизации жидких отходов. Поступление MnO в составе сточных вод в открытые водоемы, являющиеся источниками питьевого водоснабжения населения, представляет собой потенциальную опасность для здоровья человека. Однако последствия воздействия на организм MnO при пероральном поступлении с питьевой водой практически не изучены. В исследовании выполнена оценка изменения показателей активности процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты, баланса медиаторов ЦНС в сыворотке крови при пероральном введении через зонд крысам линии Wistar водной суспензии нанодисперсного MnO с размером частиц 15–29 нм. Дозы MnO 260, 50, 10 и 5 мг/кг массы тела/сут. вводили ежедневно в течение 90 дней. Показано, что MnO вызывает активацию перекисного окисления липидов (по повышению уровня гидроперекисей липидов и малонового диальдегида в сыворотке крови) и снижение активности антиоксидатной системы (по снижению уровня общего антиоксидатного статуса и Cu/Zn-супероксиддисмутазы в сыворотке крови). Установлено нарушение соотношения нейромедиаторов по повышению уровня глутамата и снижению уровня γ-аминомасляной кислоты в сыворотке крови. В дозе 5 мг/кг в день нанодисперсный MnO перечисленных эффектов не вызывает. Установленные негативные эффекты подтверждаются морфологическими изменениями в тканях мозга (в коре больших полушарий и мозжечке).

Ключевые слова: оксид марганца, наночастицы, головной мозг, нейротоксичность, оксидантный стресс, антиоксидантная активность.

© Зайцева Н.В., Землянова М.А., Звездин В.Н., Акафьева Т.И., Мазунина Д.Л., Довбыш А.А., 2014

Зайцева Нина Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор (e-mail: znv@fcrisk.ru; тел. +7 (342) 237-25-34).

Землянова Марина Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом биохимических и цитогенетических методов диагностики (e-mail: zem@fcrisk.ru; тел. 8 (342) 236-39-30).

Звездин Василий Николаевич – научный сотрудник отдела биохимических и цитогенетических методов диагностики (e-mail: zvezdin@fcrisk.ru; тел. 8 (342) 237-18-15).

Акафьева Татьяна Игоревна – специалист по нанотехнологиям лаборатории биохимической и наносенсорной диагностики (e-mail: tania.akafeva@gmail.com; тел. +7 (912) 589-11-49).

Мазунина Дарья Леонидовна – аспирант (e-mail: mix.darja2011@yandex.ru; тел. 8 (342) 236-39-30).

Довбыш Анастасия Александровна – научный сотрудник лаборатории биохимической и наносенсорной диагностики (e-mail: dovnastja@yandex.ru.ru; тел. +7 (912) 988-87-17).

Уникальные физико-химические свойства наночастиц оксида марганца имеют большой потенциал для широкого использования в приоритетных направлениях развития нанотехнологий – электронике, оптике, синтетической нанохимии. В частности, наночастицы оксида марганца применяются в качестве активной субстанции при производстве сенсорных электродов, наномагнитных и сорбирующих материалов, нанокатализаторов, полупроводниковых термистеров [18]. Несмотря на многообещающие возможности, наночастицы оксида марганца могут представлять определенную угрозу для здоровья и безопасности человека и вызывать в будущем развитие серьезных социально-экономических и этических проблем [3]. Возможно прямое экспонирование работающих в процессе производства и населения, являющегося потребителями данной продукции, при ингаляционном и пероральном с питьевой водой путях поступления.

Наночастицы оксида марганца ввиду своих небольших размеров и высокой проникающей способности могут преодолевать гематоэнцефалический барьер и вызывать морфофункциональные нарушения различных отделов центральной нервной системы при различных путях поступления в организм даже в небольших концентрациях [17]. Оценка риска воздействия наночастиц оксида марганца в основном сосредоточена на ингаляции как наиболее вероятном пути поступления в организм. По данным работ ряда авторов [12], можно предположить, что в определенных условиях наночастицы оксида марганца могут оказывать неблагоприятное, в том числе токсическое, воздействие на организм при ингаляционном поступлении. Для них характерна активная каталитическая генерация реакционно-способных активных форм кислорода (АФК), которая выявлена в альвеолярных эпителиальных клетках человека после 24-часовой экспозиции [6], при этом увеличивается уровень внеклеточной и внутриклеточной окисленной формы глутатина на 30 и 80 % соответственно [12]. Наночастицы оксида марганца (IV) размером до 30 нм при ингаляционном воздействии способны проникать внутрь нейроноподобных клеток PC-12 головного мозга по обонятельному нерву [14, 19], накапливаться в клетках головного мозга – астроцитах [14, 19]. При этом наблюдается незначительное угнетение митохондриальной деятельности, происходит дозозависимое уменьшение концентрации дофамина и его метаболитов: дигидроксифенилуксусной кислоты и гомованилиновой кислоты. Данный процесс сопровождается многократным увеличением АФК [11] и проявляется у экспериментальных животных нейродегенеративными нарушениями уже через 2–3 недели экспозиции [14, 19], активацией протеолитического расщепления, опосредованного каспазой-3 и протеинкиназой Cδ (ферментами, участвующими в процессах апоптоза, некроза и воспалительных процессах), а также активацией цикла фосфорилирования [5, 9, 10, 13]. По данным других авторов, при интраназальном введении наночастиц оксида марганца (IV) в дозе 2,63 мг/кг массы тела в течение 6 недель у крыс наблюдается появление нейротоксичности по увеличению относительного рефрактерного периода хвостового нерва [17]. При интратрахеальном введении изучаемого соединения в аналогичной дозе в течение 6 недель зафиксировано значительное снижение массы тела, удлинение абсолютного рефрактерного периода хвостового нерва, уменьшение подвижности животных [17]. Нейротоксичность наночастиц оксида марганца (IV) при интратрахеальном введении в дозах 2,63 и 5,26 мг/кг также проявляется в увеличении латентного периода возникновения коркового потенциала (суммарного ответа больших популяций нейронов коры на приходящий к ним синхронный поток импульсов, возникающий под воздействием афферентного раздражителя) в визуальной, слуховой и первой соматосенсорной области. Данный эффект может быть обусловлен нарушением функций мембран нейронов в результате перекисного окисления мембранных липидов, сопровождающегося нарушением го-

меостаза кальция [7]. Установлено, что после 24 часов воздействия наночастиц оксида марганца на альвеолярные эпителиальные клетки в культуре уровень внеклеточной и внутриклеточной формы восстановленного глютатиона увеличивается на 30 и 80 % соответственно. Концентрация окисленного глютатиона возрастает после 24 часов воздействия наночастиц оксида марганца, что может быть связано с активацией синтеза γ-глутамилцистеинсинтетазы и повышением активности транспортной системы аминокислот цистина и глутамата, которые являются субстратами для синтеза восстановленной формы глютатиона [6].

В настоящее время растет интерес использования наночастиц оксида марганца в качестве сорбента и катализатора для комплексной очистки жидких радиоактивных отходов, представляющих опасность для здоровья человека. При этом возможно поступление наночастиц оксида марганца в составе сточных вод в воду поверхностных водоемов, являющихся источниками питьевого водоснабжения населения. В связи с этим исследование токсических эффектов воздействия наночастиц оксида марганца при оральном пути поступления с питьевой водой является важным шагом в оценке их безопасности.

Проведенные ранее исследования показали, что при однократном введении через зонд водной суспензии нанодисперсного оксида марганца с размером частиц 15–29 нм среднесмертельная доза (LD_{50}) для мышей BALB/C составляет 2340,0±602,6 мг/кг массы тела, для крыс линии Wistar – 2577,0±669,6 мг/кг [4].

Целью данного исследования являлась оценка эффектов субхронической экспозиции водной суспензии наноразмерного оксида марганца на центральную нервную систему, а также активность окислительных и антиоксидантных процессов у крыс при пероральном пути поступления с питьевой водой.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования выполнены с использованием водной суспензии оксида марганца (MnO) с размером частиц 15–29 нм и концентрацией оксида марганца 41,37±2,5 мг/мл. Частицы имели несферическую нитевидную форму и удельную площадь поверхности 150,23 $м^2$/г. Синтез водной суспензии нанодисперсного MnO осуществлен в лаборатории многофазных дисперсных систем Института технической химии Уральского отделения РАН с использованием стандартного метода жидкокристаллического темплатирования, который относится к нанотехнологиям и позволяет получать материалы с уникальными текстурно-структурными характеристиками (высокая удельная поверхность, однородное распределение пор по размерам и их упорядоченность) [20]. Для предотвращения роста частиц использовали нанореакторы – мицеллы поверхностно-активного вещества (ПАВ) – цетилтриметиламмония бромид (CTAB, $C_{16}H_{33}(CH_3)_3NBr$), приобретенные в компании Sigma-Aldrich. CTAB не входит в состав конечного продукта, так как удаляется прокаливанием или экстракцией на конечном этапе. Синтез осуществлен следующим образом: навеску CTAB растворяли в спирте при комнатной температуре в условиях интенсивного перемешивания в течение 30 минут (CTAB/EtOH=1:10). В спиртовый раствор CTAB добавляли предварительно приготовленный водный раствор 0,4M $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ и перемешивали в течение 24 часов для образования микроэмульсионной системы. Затем при постоянном перемешивании медленно, по каплям, добавляли 0,05M водный раствор $KMnO_4$. Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 24 часов до завершения реакции. Темно-коричневый осадок отмывали от растворимых продуктов реакции дистиллированной водой. CTAB удаляли экстракцией этанолом (степень экстракции составила не менее 98 %). Остаточную концентрацию CTAB в водной суспензии нанодисперсного MnO после экстракции определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Остаточное содержание CTAB в суспензии ниже порога определения (0,00001 мг/мл). Матриксом суспензии являлась бидистиллированная вода.

Распределение частиц MnO в водной суспензии по размеру и форме частиц контролировали методом динамического лазерного светорассеяния (DLS), методом сканирующей электронной микроскопии (SEM). Удельную площадь поверхности частиц MnO (S_{BET}) рассчитывали по методу, предложенному Брунауэром, Эмметом и Тейлором [2], после дегазации исследуемого материала в вакууме при температуре 350 °C в течение 3 часов. Концентрацию MnO в водной суспензии определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS). Непосредственно перед проведением исследований и еженедельно в течение 90 дней эксперимента осуществляли диспергирование водной суспензии нанодисперсного MnO для равномерного распределения частиц в объеме с помощью ультразвука при комнатной температуре в режиме непрерывной пульсации при 65%-ной мощности в течение 2 минут.

Результаты оценки физико-химических параметров оксида марганца соответствовали данным, опубликованным ранее изготовителями.

Исследования были сосредоточены на анализе соотношения основных медиаторов центральной нервной системы: «возбуждающего» нейромедиатора – глутамата, действующего на NMDA-рецепторы и Не-NMDA-рецепторы, а также «тормозного» нейромедиатора – γ-аминомасляной кислоты (ГАМК), действующей прежде всего на ГАМКд- и ГАМКв-рецепторы нейронов (наборы реагентов Immundiagnostik, Германия). Активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) на уровне клеточных мембран исследовали по содержанию начального и конечного продукта ПОЛ – гидроперекиси липидов (набор Biomedica, Словацкая республика) и малонового диальдегида (МДА) соответственно. Активность антиоксидантной системы анализировали по содержанию антиоксидантного фермента – Cu/Zn-супероксиддисмутазы (Cu/ZnСОД) (набор eBioscience, Австрия), общего антоксидантного статуса (ОАС) (набор Immundiagnostik, Германия) в сыворотке крови. Определение биохимических показателей выполнено при помощи наборов в соответствии с протоколом использования автоматического иммуноферментного микропланшетного анализатора Infinite-F50 (Tecan, Австрия).

Экспериментальные исследования выполнены на самцах и самках крыс линии Wistar в 4-недельном возрасте с массой тела 120±10 г, приобретенных в питомнике «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий РАН. Все животные до начала эксперимента находились в карантине в течение 14 суток и содержались по 2 особи в клетках, выполненных из полипропилена и имеющих стандартный размер. Клетки находились в помещении с вентиляцией, постоянной температурой воздуха 23,0±2,0 °C и влажностью воздуха 60,0±5,0 %. Животные получали полусинтетический рацион, пищевая и биологическая ценность которого полностью удовлетворяли физиологические потребности. Доступ к пище и воде не ограничивали. Все исследования и процедуры выполнены в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986), и этическим комитетом ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения».

Дозы водной суспензии нанодисперсного MnO (260, 50, 10 и 5 мг/кг массы тела/сут.), что составляет 1/10, 1/50, 1/250 и 1/500 LD50, вводили внутрижелудочно через зонд с учетом веса животных в течение 90 дней (один раз в день – утром, семь дней в неделю). Дозу рассчитывали и варьировали за счет изменения объема водной суспензий нанодисперсного MnO (в мл) без разбавления. Объем вводимой жидкости не превышал максимальный объем, рекомендованный OECD для водных растворов исследуемых веществ (20 мл/кг/сут.) и составил 1,5 мл. Всего в эксперименте участвовало 100 особей крыс линии Wistar, распределенных на 5 групп (группы 1–4 – опытные,

группа 5 – контрольная, по 10 особей самцов и самок в каждой группе). Контрольная группа животных получала аналогичным способом дистиллированную воду в том же объеме. У животных всех групп для определения уровня исследуемых биохимических показателей в сыворотке крови производили забор крови из хвостовой вены до начала эксперимента (исходный уровень), на 30-й, 60-й, 90-й день эксперимента.

Выведение животных из эксперимента осуществляли на 91-й день щадящим методом эвтаназии при помощи углекислого газа. Для изучения нейротоксического действия нанодисперсного оксида марганца у экспериментальных животных производили отбор головного мозга при помощи специализированного инструмента для выполнения морфологических исследований.

Отобранный материал (головной мозг) фиксировали в 5%-ном водном нейтральном забуференном растворе формалина в соотношении 1:50. Фиксированную ткань обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, затем пропитывали хлороформом и парафином, после этого заливали гомогенизированной парафиновой средой Histomix. С парафиновых блоков получали гистосрезы толщиной 4 мкм на санном микротоме модели JUNG SM 2000R (Leica, Германия). Гистологические срезы окрашивали по общепринятой методике гематоксилином Эрлиха и эозином. Микроскопирование препаратов выполняли на светооптическом микроскопе Axiostar (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии выполнены при светооптической микроскопии на приборе MEIJI (Techno, Япония), снабженном камерой microscopy VISION (VISION, Канада) при увеличении ×100, ×200, ×400.

Информацию анализировали с помощью статистического пакета Statistica 6.0; математическую обработку результатов – с помощью параметрических методов статистики. Для оценки достоверности различий полученных данных использовали критерий Стьюдента (*t*). Различия полученных результатов являлись статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$ [1].

Результаты и их обсуждение. Оценка показателей активности перекисного окисления липидов у экспериментальных животных показала, что у самцов и самок крыс в группах 1–3 на 30-й день эксперимента зарегистрировано достоверное повышение в сыворотке крови гидроперекиси липидов и МДА относительно исходного уровня и показателей контрольной группы в 1,4–1,9 и 1,6–2,0 раза соответственно ($p<0{,}001$). На 90-й день сохранялся повышенный уровень гидроперекиси липидов и МДА в сыворотке крови, кратность различий с исходным уровнем и показателями в контроле составила 1,3–1,9 раза ($p<0{,}001$). У животных группы 4 данные показатели в течение всего эксперимента не имели достоверных различий с исходным уровнем и с контролем (табл. 1).

Оценка показателей активности антиоксидантной системы позволила установить, что у крыс в группах 1–3 регистрируется достоверное снижение уровня антиоксидантного фермента Cu/ZnСОД в сыворотке крови. При этом наибольшее снижение в течение всего эксперимента отмечено у крыс группы 1. Уровень Cu/ZnСОД на 30-й день снизился относительно исходного уровня и контроля в среднем в 4,6 раза ($p<0{,}001$), на 60-й и 90-й день – в 2,5 раза ($p<0{,}001$). У крыс групп 2 и 3 уровень Cu/ZnСОД в сыворотке крови на 30-й день снизился относительно исходного уровня и контроля в 1,4–1,9 раза ($p<0{,}002$) и сохранялся достоверно сниженным до 90-го дня эксперимента ($p<0{,}002$). Аналогичные изменения уровня ОАС в сыворотке крови относительно исходного уровня и контроля зарегистрированы у крыс групп 1–3 ($p<0{,}001$). При этом максимальное снижение ОАС в 5,1 раза относительно контрольной группы и в 5,4 раза относительно исходного уровня установлено у животных в группе 1 на 30-й и 90-й день ($p<0{,}001$). У крыс групп 2 и 3 снижение ОАС в сыворотке крови на 30-й день составило относительно контроля 2,2–2,4 раза, относительно исходного уровня – 2,3–2,6 раза ($p<0{,}001$). На 90-й день эксперимента снижение ОАС в сыворотке

Таблица 1

Оценка активности окислительных и антиоксидантных процессов у крыс линии Wistar при пероральной экспозиции водной суспензии нанодисперсного MnO

Группа	Показатель (*M*±*m*)			
	ОАС, мкмоль/л	Cu/ZnСОД, нг/мл	Гидроперекиси липидов, мкмоль/л	МДА, мкмоль/мл
30-й день				
Исходный уровень	174,1±10,13	5,01±1,01	30,76±2,64	1,62±0,20
Контрольная	164,26±8,29	5,20±1,01	32,07±3,04	1,60±0,12
1	31,95±3,35*^	1,10±0,04*^	62,21±5,50*^	3,12±0,01*^
2	75,36±6,94*^	2,67±0,36*^	48,88±6,07*^	2,74±0,29*^
3	68,97±4,73*^	3,67±0,25*^	46,71±5,67*^	2,61±0,34*^
4	153,21±5,13	5,12±0,13	33,12±3,03	1,72±0,51
60-й день				
Контрольная	173,95±4,64	5,28±0,51	32,08±0,19	1,59±0,16
1	35,51±4,69*^	2,23±0,25*^	35,34±4,39	3,15±0,22*^
2	68,14±12,76*^	3,38±0,32*^	68,23±12,61*^	2,50±0,34*^
3	68,87±7,35*^	4,15±0,32*^	91,35±8,24*^	2,34±0,45*^
4	164,8±6,20	5,20±1,01	32,07±3,04	1,69±0,15
90-й день				
Контрольная	163,5±7,3	5,12±0,13	33,12±3,03	1,73±0,19
1	31,95±3,35*^	2,05±0,39*^	62,2±9,58*^	3,24±0,29*^
2	68,97±6,21*^	4,78±0,27*^	44,86±3,25*^	2,44±0,20*^
3	99,42±4,73*^	3,61±0,17*^	46,71±0,22*^	2,25±0,52*^
4	157,5±10,9*	5,17±0,13	32,12±2,11	1,75±0,22

Примечание: * – $p<0,05$ в сравнении со значением уровня показателя перед началом эксперимента; ^ – $p<0,05$ в сравнении со значением уровня показателя контрольной группы.

крови у крыс в группе 2 составило относительно исходного уровня и контроля 2,5 и 2,4 раза, в группе 3 – 1,6 и 2,4 раза соответственно ($p<0,001$). У крыс группы 4 уровень ОАС не имел достоверных отличий от показателя в контрольной группе в течение всего эксперимента.

Оценка содержания медиаторов центральной нервной системы у экспериментальных животных на 90-й день показала, что в группах 1–3 концентрация «возбуждающей» аминокислоты – глутамата в сыворотке крови достоверно повышена относительно исходного уровня и контроля. При этом наибольшее повышение (в 3,8 раза) отмечено в группе 1 ($p<0,001$). У крыс групп 2 и 3 повышение концентрации глутамата составило 2,0–2,5 раза ($p<0,001$). У крыс группы 4 концентрация глутамата не имела достоверных отличий с исходным уровнем и с контролем. Уровень «тормозной» аминокислоты – ГАМК – в сыворотке крови достоверно снижен относительно исходного уровня и контроля. У животных в группе 1 концентрация ГАМК снижена в 2,3 раза, в группе 2 – в 2,7 раза ($p<0,001$), в группе 3 – в 2,5 раза ($p<0,001$). У крыс группы 4 достоверного снижения концентрации анализируемого показателя в сыворотке крови относительно контроля не установлено (табл. 2).

Результаты оценки гистологических препаратов головного мозга экспериментальных животных позволили установить наличие морфологических изменений структуры тканей в зависимости от дозы водной суспензии нанодисперсного MnO. Тестируемое вещество при пероральном поступлении в дозе 260 мг/кг массы тела/сут. обусловливает в коре больших полушарий и мозжечке резкое полнокровие сосудов с диапедезом эритроцитов и формированием очаговых кровоизлияний (рис. 1, *а*, *б*), субарахноидальные кровоизлияния, отёк

Таблица 2

Оценка баланса медиаторов ЦНС при пероральной экспозиции водной суспензии нанодисперсного MnO на 90-й день эксперимента

Группа	Показатель (*M*±*m*)	
	Глутамат, мкмоль/л	ГАМК, мкмоль/л
Исходный уровень	242,1±18,2	0,32±0,03
Контрольная	243,4±33,2	0,31±0,04
1	917,5±117,6*^	0,14±0,02*^
2	607,5±56,7*^	0,12±0,04*^
3	474,8±82,3*^	0,13±0,02*^
4	254,1±12,2	0,30±0,02

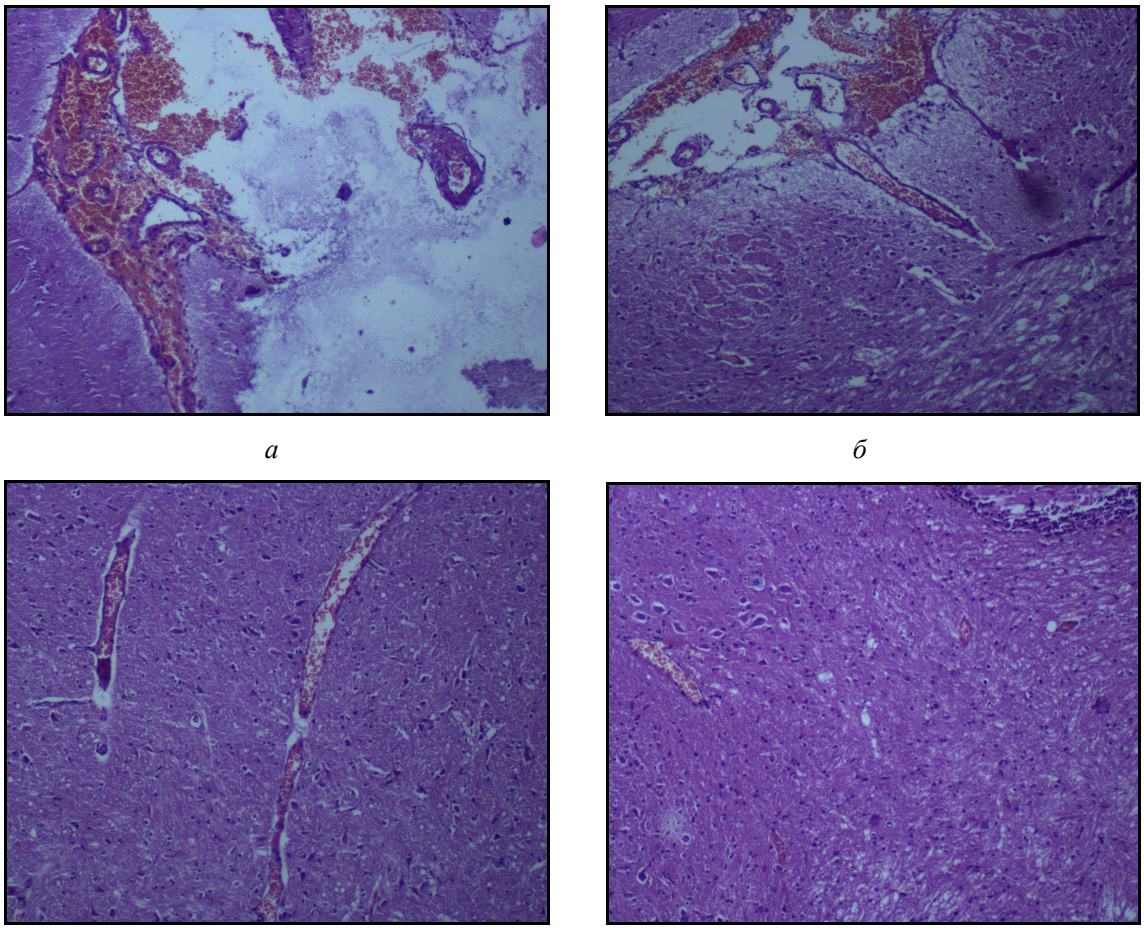


Рис. 1. 90-й день эксперимента при внутрижелудочном введении нанодисперсного MnO в дозе 260 мг/кг массы тела/сут., ув. ×200. Окраска гематоксилином и эозином: *а* – кора больших полушарий; *б* – мозжечок; *в* – кора больших полушарий крысы; *г* – мозжечок крысы

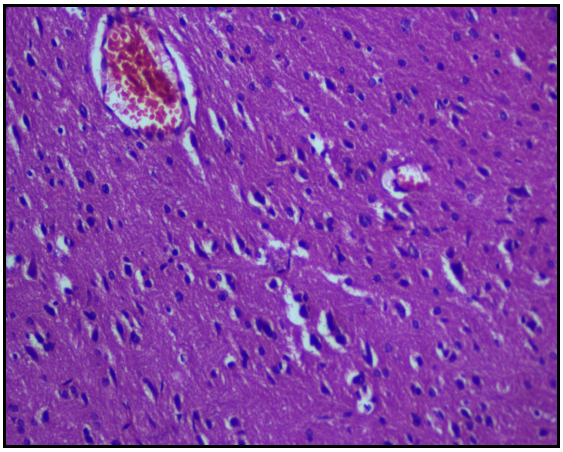
головного мозга с расширением периваскулярных и перицеллюлярных пространств (рис. 1, *в*), очаги демиелинизации нервных волокон, установленные по неравномерному окрашиванию волокон белого вещества, наличию зон просветления с нечёткими контурами (рис. 1, *г*).

При пероральном поступлении водной суспензии наночастиц MnO в дозе 50 мг/кг формируются очаговые расширения пери-

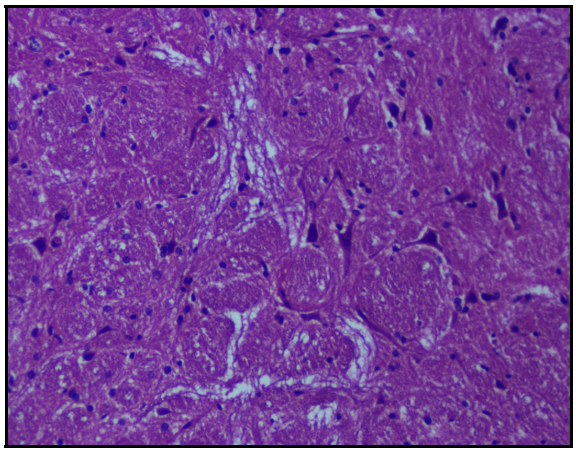
васкулярных и перицеллюлярных пространств в слоях коры головного мозга, дифференцировка которых сохранена (рис. 2, *а*). Сосуды вещества анализируемых тканей тонкостенные, умеренного кровенаполнения, эндотелий уплощен, имеются очаговые мелкие субарахноидальные кровоизлияния и небольшие единичные участки бледно окрашенных истончённых нервных волокон (рис. 2, *б*), что свидетельствует об очаговой дистрофии нейронов.

Пероральное поступление наночастиц MnO в дозе 10 мг/кг массы тела/сут. обусловливает незначительное расширение периваскулярных пространств (рис. 3, *а*). При экспозиции в дозе 5 мг/кг морфологическая картина тканей головного мозга и мозжечка соответствует таковой в контрольной группе (рис. 3, *б*) и характеризуется сохранением рисунка строения во всех отделах.

Слои коры головного мозга хорошо дифференцируются. Наружный зернистый слой образован плотным скоплением многочисленных мелких нейронов; пирамидный слой коры головного мозга широкий, представлен полиморфными нейронами.

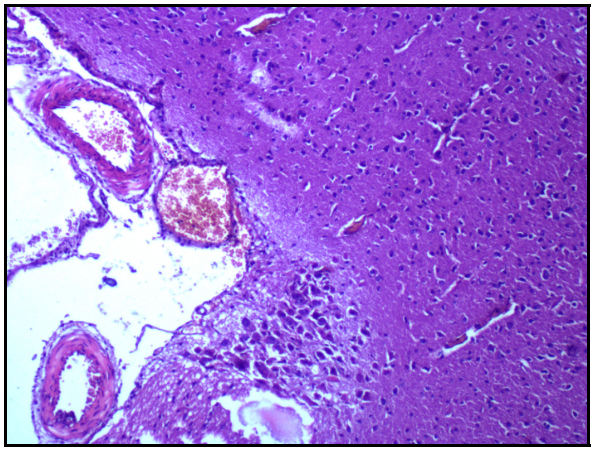


а

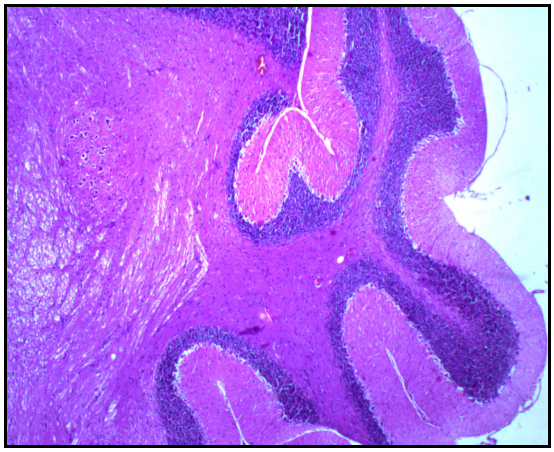


б

Рис. 2. Кора больших полушарий крысы на 90-й день эксперимента при внутрижелудочном введении нанодисперсного MnO в дозе 50 мг/кг массы тела/сут., ув. ×400. Окраска гематоксилином и эозином: *а* – расширенные периваскулярные и перицеллюлярные пространства в слоях коры головного мозга крысы, *б* – истончённые нервные волокна в коре больших полушарий крысы



а



б

Рис. 3. 90-й день эксперимента при внутрижелудочном введении нанодисперсного MnO. Окраска гематоксилином и эозином: *а* – кора больших полушарий крысы, доза 10 мг/кг массы тела/сут., ув. ×200; *б* – мозжечок крысы, доза 5 мг/кг, ув. ×100

Внутренний зернистый слой тканей коры головного мозга и мозжечка тонкий, прерывистый, образован мелкими пирамидными и звёздчатыми клетками; клетки ганглионарного слоя ткани коры головного мозга крупные, полиморфные с тёмными ядрами, диффузно расположены; в слое полиморфных клеток большое количество разнообразных по форме и размерам нейронов. Ганглионарный слой ткани мозжечка представлен одним рядом клеток Пуркинье с хорошо развитой эозинофильной зернистой цитоплазмой, округлыми тёмными ядрами. Молекулярный слой ткани мозжечка рыхлый, содержит небольшое количество мелких клеток. Белое вещество в ткани головного мозга и мозжечка представлено пучками равномерно окрашенных нервных волокон и округлыми глиальными клетками. Сосуды вещества мозга тонкостенные, слабого и умеренного кровенаполнения.

Установленные эффекты (нарушение баланса окислительно-антиоксидантных процессов, медиаторов ЦНС, морфологических изменений в структуре тканей коры головного мозга и мозжечка) свидетельствуют о негативном воздействии на экспериментальных животных водной суспензии нанодисперсного MnO при внутрижелудочном введении через зонд в течение 90 дней в дозах 260, 50, 10 мг/кг массы тела/сут. При введении нанодисперсного MnO в дозе 5 мг/кг достоверного изменения уровня анализируемых биохимических показателей и морфологических изменений тканей относительно контрольных показателей не установлено.

Обобщение полученных материалов позволило дать характеристику возможного механизма токсического действия исследуемых нанодисперсных частиц MnO при пероральном поступлении. Пусковым механизмом может являться активация перекисного окисления липидов в результате прямого повреждающего действия нанодисперсного MnO на билипидный слой цитоплазматической мембраны [11, 12]. Данный эффект проявляется на системном уровне увеличением уровня гидроперекисей липидов, МДА, что приводит к снижению активности антиоксидантных процессов [11]. Подтверждением недостаточности антиоксидантных процессов является снижение уровня Cu/ZnСОД и ОАС в сыворотке крови. По результатам проведенного исследования установлено, что клетками-мишенями для водной суспензии нанодисперсного MnO при пероральном поступлении, так же как и при ингаляционной экспозиции, являются астроциты и мембраны нейронов [8, 10, 13]. В случае перорального поступления это может быть обусловлено выраженной способностью нанодисперсных частиц MnO, как и других металлов, проникать из желудочно-кишечного тракта в кровь. Из кровяного русла наночастицы MnO достигают тканей мозга при поступлении через капиллярные эндотелиальные клетки гематоэнцефалического барьера с последующим накоплением в клетках головного мозга – астроцитах [10, 13]. Поврежденные астроциты в результате усиления перекисного окисления липидов клеточных мембран и образования активных форм кислорода могут утрачивать способность захватывать и обезвреживать избыточные количества «возбуждающей» аминокислоты – глутамата, что способствует эксайтотоксическому эффекту [21]. Это проявляется увеличением концентрации глутамата и снижением ГАМК в сыворотке крови.

Морфологические изменения тканей головного мозга подтверждают потогенетическое действие наночастиц MnO, установленное при оценке биохимических показателей. Развитие дегенеративных изменений может быть обусловлено прямым окислительным воздействием наночастиц на нейроны, клетки глии и эндотелий сосудов. Установленные эффекты мог быть обусловлены только непосредственным контактом наночастиц с тканями головного мозга, что свидетельствует о вероятном преодолении гематоэнцефалического барьера.

Выводы. Настоящее исследование показало, что водная суспензия нанодисперсного MnO при ежедневном внутрижелудочном введении через зонд крысам линии

Wistar в дозах 260, 50, 10 мг/кг массы тела/сут. в течение 90 дней вызывает активацию перекисного окисления липидов (по повышению уровня гидроперекисей липидов и МДА в сыворотке крови), снижение активности антиоксидатной системы (по снижению концентрации ОАС и Cu/ZnСОД в сыворотке крови), повреждение мембран астроцитов и нейронов и нарушение соотношения нейромедиаторов (по повышению концентрации глутамата и снижению ГАМК в сыворотке крови), полнокровие сосудов, субарахноидальное кровоизлияние, отёк головного мозга с расширением периваскулярных и перицеллюлярных пространств, очаги демиелинизации нервных волокон, очаговые дистрофические изменения эндотелия сосудов.

В дозе 5 мг/кг массы тела/сут. водная суспензия нанодисперсного MnO установленных эффектов не вызывает.

В настоящее время существует недостаточное количество нормативно-методических документов, регулирующих использование наноматериалов, особенно при их поступлении в организм с питьевой водой. Для того чтобы оценить безопасность таких продуктов, в том числе нанодисперсного MnO, при пероральном поступлении с питьевой водой, необходимо продолжить исследования, выходящие за рамки установленной токсичности*.

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

2. Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость. – М: Мир, 1984. – 306 с.

3. Онищенко Г.Г. Стратегия безопасности наноиндустрии // Здоровье населения и среда обитания. – 2011. – № 5. – С. 4–8.

4. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности нано- и микродисперсного оксида марганца (III, IV) / Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, В.Н. Звездин, Е.В. Саенко, А.В. Тарантин, Р.Р. Махмудов, О.В. Лебединская, С.В. Мелехин, Т.И. Акафьева // Вопросы питания. – 2012. – Т. 81, № 5. – С. 13–19.

5. Afeseh Ngwa H., Kanthasamy A., Gu Y., Fang N. Manganese nanoparticle activates mitochondrial dependent apoptotic signaling and autophagy in dopaminergic neuronal cells // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2011. – Vol. 256. – P. 227–240.

6. Comparison of manganese oxide nanoparticles and manganese sulfate with regard to oxidative stress, uptake and apoptosis in alveolar epithelial cells / R. Frick, B. Müller-Edenborn, A. Schlicker, B. Rothen-Rutishauser // Toxicol Lett. – 2011. – Vol. 205. – P. 163–172.

7. Crittenden P.L, Filipov N.M. Manganese-induced potentiation of in vitro proinflammatory cytokine production by activated microglial cells is associated with persistent activation of p38 MAPK // Toxicology in Vitro. – 2008. – Vol. 22. – P. 18–27.

8. Diana M. Neurotoxicity of manganese oxide nanomaterials // J. Nanopart. Res. – 2009. – Vol. 11. – P. 1957–1969.

9. Expression changes of dopaminergic system-related genes in PC12 cells induced by manganese, silver, or copper nanoparticles / J. Wang, M. Rahman, H. Duhart, G. Newport // NeuroToxicology. – 2009. – Vol. 30. – P. 926–933.

10. General and electrophysiological toxic effects of manganese in rats following subacute administration in dissolved and nanoparticle form / E. Horváth, Z. Máté, S. Takács, P. Pusztai, A. Sapi, Z. Kónya // Scientific World Journal. – 2012. DOI: 10.1100/2012/520632. – URL: http: //www.hindawi.com/journals/tswj/2012/520632/ (дата обращения: 26.09.2014).

11. Hussan Saber M. The interaction of manganes nanoparticles with pc–12 cells induces dopamine depletion // Toxicol. Science. – 2006. – Vol. 92. – P. 456–463.

12. NF–kB inhibits TNF–induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death / S. Sakon, X. Xue, M. Takekawa, T. Sasazuki, T. Okazaki, Y. Kojima [et al.] // EMBO J. – 2003. – Vol. 22, № 15. – P. 3898–3909.

13. Oberdorster G. Nanotoxicology: Am Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles // Environmental Health Perspective. – 2005. – Vol. 7. – P. 823–839.

14. Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain // Inhal. Toxicol. – 2004. – Vol. 16. – P. 437–445.

*Авторы хотели бы поблагодарить коллектив лаборатории многофазных дисперсных систем Института технической химии Уральского отделения Российской академии наук за предоставление водной суспензии нанодисперсного оксида марганца. Благодарим доцента, кандидата химико-физических наук Р.Р. Махмудова (Пермский государственный национальный исследовательский университет) за консультирование при работе с животными.

15. Ostiguy C., Malo S, Asselin P. Synthese des connaissances scientifiques sur les risques d'atteinte a la sante suite a une exposition professionnelle au manganese. Rapport IRSST № R-339 // IRSST. – Montreal, 2003. – 40 p.

16. Prise en charge du manganisme d'origine professionnelle: Consensus d'un groupe d'experts. Rapport IRSST № R-416 / C. Ostiguy, P. Asselin, S. Malo, D. Nadeau // IRSST. – Montreal, 2005. – 62 p.

17. Subacute intratracheal exposure of rats to manganese nanoparticles: behavioral, electrophysiological, and general toxicological effects / L. Sárközi, E. Horváth, Z. Kónya, I. Kiricsi // Inhal Toxicol. – 2009. – Vol. 21, suppl. 1. – P. 83–91.

18. The World's Manufacturer of Engineered & Advanced Materials: American Elements. 2014, available from: http: //www.americanelements.com/mnoxnp.html (last accessed: 8 July 2014).

19. Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. Environ / A. Elder, R. Gelein, V. Silva, T. Feikert, L. Opanashuk, J. Carter [et al.] // Health Perspectives. – 2006. – Vol. 114. – P. 1172–8.

20. Whitesides J., Eigler D., Anders R. Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade: IWGN Workshop Report. – Moscow, 2002.

21. Win-Shwe Tin-Tin, Fujimaki H. Nanoparticles and Neurotoxicity // J. Mol. Sci. – 2011. – Vol. 12. – P. 6267–6280.

References

1. Glanc S. Mediko-biologicheskaja statistika: per. s angl. [Biomedical Statistics: translated from English]. – M.: Praktika, 1998. – 459 s.

2. Greg S., Sing K. Adsorbcija, udel'naja poverhnost', poristost' [Adsorption, specific surface, porosity]. – M.: Mir, 1984. – 306 s.

3. Onishhenko G.G. Strategija bezopasnosti nanoindustrii [Nanoindustry safety strategy]. *Zdorov'e naselenija i sreda obitanija*. – 2011. – № 5. – S. 4–8.

4. Zajceva N.V., Zemljanova M.A., Zvezdin V.N., Saenko E.V., Tarantin A.V., Mahmudov R.R., Lebedinskaja O.V., Melehin S.V., Akaf'eva T.I. Toksikologo-gigienicheskaja ocenka bezopasnosti nano i mikrodispersnogo oksida marganca (III, IV) [Toxicological and hygienic safety assessment of nano and ultrafine manganese oxide (III, IV)]. *Voprosy pitanija*. – 2012. – T. 81, № 5. – S. 13–19.

5. Afeseh Ngwa H., Kanthasamy A., Gu Y., Fang N. Manganese nanoparticle activates mitochondrial dependent apoptotic signaling and autophagy in dopaminergic neuronal cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. – 2011. – Vol. 256. – P. 227–240.

6. Frick R, Müller-Edenborn B, Schlicker A, Rothen-Rutishauser B. Comparison of manganese oxide nanoparticles and manganese sulfate with regard to oxidative stress, uptake and apoptosis in alveolar epithelial cells // Toxicol Lett. – 2011. – Vol. 205. – P. 163–172.

7. Srittenden P.L, Filipov N.M. Manganese–induced potentiation of in vitro proinflammatory cytokine production by activated microglial cells is associated with persistent activation of p38 MAPK // Toxicology in Vitro. – 2008. – Vol. 22. – P. 18–27.

8. Diana M. Neurotoxicity of manganese oxide nanomaterials // J. Nanopart. Res. – 2009. – Vol. 11. – P. 1957–1969.

9. Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J. et al. Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. Environ // Health Perspectives. – 2006. – Vol. 114. – P. 1172–1178.

10. Horváth E., Máté Z., Takács S., Pusztai P., Sapi A., Kónya Z. General and electrophysiological toxic effects of manganese in rats following subacute administration in dissolved and nanoparticle form // Scientific World Journal. 2012. DOI: 10.1100/2012/520632. – URL: http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/520632/ (data obrashhenija: 26.09.2014).

11. Hussan Saber M. The interaction of manganes nanoparticles with pc–12 cells induces dopamine depletion // Toxicol. Science. – 2006. – Vol. 92. – P. 456–463.

12. Oberdorster G. Nanotoxicology: Am Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles // Environmental Health Perspective. – 2005. – Vol. 7. – P. 823–839.

13. Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain // Inhal. Toxicol. – 2004. – Vol. 16. – P. 437–445.

14. Ostiguy C., Asselin P., Malo S., Nadeau D. Prise en charge du manganisme d'origine professionnelle: Consensus d'un groupe d'experts. Rapport IRSST № R-416. IRSST. – Montreal, 2005. – 62 p.

15. Ostiguy C, Malo S, Asselin P. Synthese des connaissances scientifiques sur les risques d'atteinte a la sante suite a une exposition professionnelle au manganese. Rapport IRSST № R-339. IRSST. – Montreal, 2003. – 40 p.

16. Sakon S., Xue X., Takekawa M., Sasazuki T., Okazaki T., Kojima Y., et al. NF–kB inhibits TNF–induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death // EMBO J. – 2003. – Vol. 22, № 15. – P. 3898–3909.

17. Sárközi L., Horváth E., Kónya Z, Kiricsi I. Subacute intratracheal exposure of rats to manganese nanoparticles: behavioral, electrophysiological, and general toxicological effects // Inhal Toxicol. – 2009. – Vol. 21, Suppl. 1. – P. 83–91.

18. The World's Manufacturer of Engineered & Advanced Materials: American Elements. 2014. Available from: http://www.americanelements.com/mnoxnp.html [last accessed: 8 July 2014].

19. Wang J., Rahman M., Duhart H., Newport G. Expression changes of dopaminergic system-related genes in PC12 cells induced by manganese, silver, or copper nanoparticles // NeuroToxicology. – 2009. – Vol. 30. – P. 926–33.

20. Whitesides J., Eigler D., Anders R. Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade: IWGN Workshop Report. 2002. Moscow.

21. Win-Shwe Tin-Tin, Fujimaki H. Nanoparticles and Neurotoxicity // J. Mol. Sci. – 2011. – Vol. 12. – P. 6267–6280.

EFFECTS OF SUBCHRONIC EXPOSURE MANGANESE OXIDE NANOPARTICLES ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM, LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT ENZYMES IN RATS

N.V. Zaitseva[1], M.A. Zemlyanova[1], V.N. Zvezdin[1], T.I. Akafyeva[2], D.L. Mazunina[2], A.A.Dovbish[1]

[1] FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", Russian Federation, Perm, 82, Monastyrskaya St., 614045,
[2] FSBEI HPE «Perm State National Research University", Russian Federation, Perm, 15, Bukireva St., 614990

Nanodisperse particles of manganese oxide (MnO) by virtue of high reactivity are widely used as an active substance in the manufacture of sorbents and catalysts used in the liquid waste disposal technology. Receipt of MnO in the composition of wastewater into free waters, which are sources of drinking water supply, is a potential danger to human health. However, the consequences of the MnO effects on the human body by ingestion with drinking water have hardly been studied. The study estimated changes in activity indices of lipid peroxidation and antioxidant defense, balance of neurotransmitters in the central nervous system in the blood serum after oral gavage Wistar aqueous suspension of nanodiperse MnO particle in size of 15-29 nm to the rats. Doses of MnO 260, 50, 10 and 5 mg / kg body weight / day was administered daily for 7 days for 90 days. It is shown that the MnO causes lipid peroxidation (by raising of lipid hydroperoxides and malondialdehyde in the serum) and reduced activity antioksidatnoy system (bu reducing the total antioksidatnogo status and Cu / Zn-superoxide dismutase in the serum). It is found a violation of the ratio of neurotransmitter glutamate to increase and decrease the level of γ-aminobutyric acid in the blood serum. At a dose of 5 mg / kg per day nanodisperse MnO does not cause these effects. Found negative effects are confirmed by morphological changes in the brain tissue (in the cerebral hemisphere and cerebellum).

Key words: manganese oxide, nanoparticles, brain. neurotoxicity, ox stress, antioxidant activity.

© Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Zvezdin V.N., Akafyeva T.I., Mazunina D.L., Dovbish A.A., 2014

Zaitseva Nina Vladimirovna – Doctor of Medicine, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the Centre (e-mail: znv@fcrisk.ru; tel. +7 (342) 237-25-34).

Zemlyanova Marina Aleksandrovna – Doctor of Medicine, Professor, Head of Department of Biochemical and Cytogenetic Diagnostic Methods (e-mail: zem@fcrisk.ru; tel. 8 (342) 236-39-30).

Zvezdin Vasily Nikolaevich – Researcher at the Department of Biochemical and Cytogenetic Diagnostic Methods (e-mail: zvezdin@fcrisk.ru; tel. 8 (342) 237-18-15).

Akafyeva Tatiana Igorevna – Nanotechnology Specialist in the Laboratory of Biochemical and Nanosensor Diagnostics (e-mail: tania.akafeva@gmail.com; tel. +7 (912) 589-11-49).

Mazunina Darya Leonidovna – Postgraduate in PSNRU (e-mail: mix.darja2011@yandex.ru; tel. 8 (342) 236-39-30).

Dovbysh Anastasia Aleksandrovna – Researcher, Laboratory of Biochemical and Nanosensor Diagnostics (e-mail: dovnastja@yandex.ru.ru; tel. +7 (912) 988-87-17).