

УДК 57.013

**Н.А. Кривова, О.Б. Заева, М.Ю. Ходанович, О.А. Карелина,
Е.В. Гуль, А.Е. Зеленская**

Обособленное структурное подразделение «Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета» (г. Томск)

СОСТОЯНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА, ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ У КРЫС ПОСЛЕ СКАРМЛИВАНИЯ НАНО- ИЛИ МИКРОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА

Исследование выполнено при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (ГК № 14.740.11.0183 от 15.09.2010 г. и П1260 от 27.08.2009 г.).

В хронических опытах на крысах проведено исследование биологического действия нано- или микрочастиц диоксида титана (TiO_2) при физиологическом поступлении через желудочно-кишечный тракт. Установлено, что после физиологического поступления наночастиц TiO_2 (δ_{50} 12 нм, S_{90} 95 m^2/g) в дозе 250 мг/кг массы тела через желудочно-кишечный тракт наблюдаются нарушения в процессах образования и деградации пристеночного слизистого слоя желудка, усиление эрозивных повреждений слизистой оболочки желудка, увеличение про- и антиоксидантной активности пристеночной слизи. При исследовании хемилюминесцентных параметров плазмы крови было показано, что отсутствуют изменения в уровне индуцированной хемилюминесценции плазмы крови, которая характеризует количество свободных радикалов, при поступлении в организм как нано- так и микрочастиц TiO_2 . Уровень антиоксидантной активности плазмы крови, начиная с 5-й минуты реакции, повышался у крыс, получавших наночастицы TiO_2 , тогда как у крыс, получавших микрочастицы TiO_2 , этот показатель оставался на уровне контрольных значений. Это может быть проявлением компенсаторной реакции организма на поступление именно наночастиц TiO_2 . Биохимические показатели в крови крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2 , демонстрируют отсутствие значимых нарушений в исследованных системах организма в условиях нашего эксперимента.

Ключевые слова: наночастицы диоксида титана; крысы; желудок; про- и антиоксидантная активность; биохимические параметры крови.

Введение

Оценка характера воздействия наночастиц TiO_2 на организм приобретает все большую актуальность в связи с их широким распространением в окружающей среде. По-видимому, нахождение барьеров организма, распределение, накопление и выведение влияют многие факторы, например физико-химические характеристики наночастиц, пути поступления, особенности метаболизма. Наиболее вероятные пути поступления наночастиц TiO_2 – через легкие, желудочно-кишечный тракт и кожу.

Многочисленные исследования описывают неоднозначные последствия воздействия TiO_2 : было продемонстрировано развитие цитотоксичности, токсичности для организма в целом или отдельных систем [1–5] или отсутствие токсичности либо очень незначительная токсичность [6–8] наночастиц TiO_2 . Было показано также, что после поступления в организм наночастицы могут накапливаться в отдельных органах или системах [9] или, возможно, не накапливаться, поэтому требуется детальное изучение функционирования многих систем для того, чтобы приблизиться к оценке характера их биологического действия.

Одним из основных путей, и часто неконтролируемым, является поступление их через желудочно-кишечный тракт. Поступление нано- и микрочастиц диоксида титана (TiO_2) в организм через желудочно-кишечный тракт происходит разными путями: с пищей (как пищевая добавка E 171), с лекарственными веществами (как вспомогательное вещества), из окружающего воздуха и т.п. [10–13]. Однако до настоящего времени практически нет данных о том, как в условиях целого организма взаимодействуют частицы TiO_2 разной степени дисперсности со структурными элементами желудка, прежде всего пристеночным слизистым слоем и слизистой оболочкой, которые являются обязательными этапами транспорта веществ во внутреннюю среду организма. При этом состояние пристеночного слизистого слоя и слизистой оболочки желудка в значительной степени определяют его функциональную активность, состояние барьерной функции, эффективность всасывания, состоятельность интрамуральных регуляторных процессов и других функций пищеварительной системы в целом [14].

Целью данного исследования было изучение состояния желудка и его защитного барьера, а также биохимических параметров крови, характеризующих состояние основных систем организма, при физиологическом поступлении наночастиц TiO_2 через желудочно-кишечный тракт крыс.

Материалы и методики исследования

Экспериментальные животные. Хронические опыты были поставлены на крысах-самцах аутбредного стока Wistar разведения питомника НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск) массой тела около 180 г до начала эксперимента. Животных содержали в вентилируемом помещении при температуре 20°C, при световом режиме 12/12 (освещение с 8.00 ч), на стандартном пищевом рационе вивария, при свободном доступе к воде и пище, в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

Порядок постановки опытов. В день поступления все крысы были промаркированы с помощью разрезов на ушах. После 10-дневного карантина до начала эксперимента все крысы были протестированы в «открытом поле». По результатам теста из поступивших 60 крыс были отобраны 30 животных, показавших средние значения двигательной активности в «открытом поле». Эти животные со сбалансированными процессами возбуждения и торможения в центральной нервной системе при действии стрессирующего фактора (ситуация «новизны») и были взяты в эксперимент. Отобранные животные были

взвешены и распределены случайным образом на три серии опытов: контроль, закармливание наночастицами диоксида титана (12 нм) (наночастицы TiO_2) и закармливание микрочастицами диоксида титана (175 нм) (микрочастицы TiO_2). В каждой серии использовалось по 10 животных.

При проведении хронического эксперимента в течение 7 дней опытные животные получали при кормлении по 50 мг (250 мг/кг) того или иного порошка диоксида титана. Процедура скармливания диоксида титана была разработана таким образом, чтобы обеспечить контролируемый и физиологичный способ поступления в организм нано- или микрочастиц TiO_2 : ежедневно в 10 ч утра крыс рассаживали в индивидуальные клетки и предлагали им порошок диоксида титана с привлекательным кормом (блинчик площадью около 20 см²). Животные находились в индивидуальных клетках до тех пор, пока они полностью не съедали весь корм. Животные контрольной серии, аналогичным образом рассажённые в индивидуальные клетки, получали только привлекательный корм.

После окончания опытов (через 24 ч после последнего скармливания порошков диоксида титана) все крысы были снова взвешены, затем под легким эфирным наркозом из бедренной вены была взята кровь для изучения уровня биохимических параметров крови, хемилюминесценции плазмы и ее антиоксидантной активности. Эвтаназия проводилась с помощью декапитации животного под легким эфирным наркозом.

Подготовка слизистой желудка. После эвтаназии животных из брюшной полости извлекали желудок, затем со стороны привратниковой части зажимали его пинцетом и осторожно выворачивали наизнанку. Прополаскивали слизистую оболочку желудка проточной водой и помещали в физиологический раствор на 18 ч. Затем вывернутый наизнанку желудок натягивали на плоский пластиковый шпатель и собирали пристеночную слизь с обеих сторон при помощи тонкого металлического шпателя.

Определение массы пристеночной слизи желудка. Первоначально на весах AND (Япония) взвешивали пробирку, в которую был добавлен 1 мл физиологического раствора, затем в эту пробирку помещали металлический шпатель с собранной пристеночной слизью и смывали слизь со шпателя. Далее пробирку опять взвешивали. Массу слизи определяли по разнице между вторым и первым взвешиванием.

Определение области эрозивного повреждения слизистой оболочки желудка. После растягивания желудка на шпателе проводили макросъемку слизистой желудка с обеих сторон при помощи цифрового фотоаппарата Canon (Япония).

Области эрозивного повреждения слизистой оболочки желудка определяли при помощи компьютерной программы Image J 1.42, предназначенной для ввода, автоматического преобразования и анализа изображений в медицине и биологии.

Определение прооксидантной и антиоксидантной активности плазмы крови и пристеночной слизи желудка. Прооксидантную активность (индуцированная хемилюминесценция) плазмы крови и пристеночной слизи желудка, их антиоксидантную активность определяли с помощью кюветного

биолюминометра Lumat LB9507 (Berthold Technologies, Германия). Индукцию хемилюминесценции плазмы крови проводили с помощью люминола (Sigma), измерения проводили в течение 10 мин, время экспозиции 0,1 с.

Антиоксидантную активность плазмы крови и пристеночной слизи желудка определяли как результат ингибирования индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции после прибавления образцов плазмы или слизи, в качестве источника радикалов использовали 0,05 М раствор сернокислого железа, измерения проводили в течение 10 мин, время экспозиции 0,1 с.

Количественно уровень хемилюминесценции и антиоксидантной активности выражали в RLU/мл (мг слизи)/с, где RLU (relative light units) = 10 фотонам.

Общие биохимические параметры плазмы крови. Определение в сыворотке крови концентрации альбумина, глюкозы, мочевины, мочевой кислоты, креатинина, холестерина, креатининфосфокиназы и ее изофермента, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы проводилось стандартными методами с помощью унифицированных наборов производства ЗАО «Вектор-Бест» на биохимическом полуавтоматическом анализаторе Stat Fax 1904 (США).

Химические вещества. В экспериментах исследовали влияние диоксида титана (TiO_2) в виде порошков двух степеней дисперсности:

1) нанодисперсный – δ_{50} 12 нм, $S_{\text{уд}}$ 95 м²/г, производства MACH I, USA, получен плазмохимическим методом;

2) микродисперсный – δ_{50} 175 нм, $S_{\text{уд}}$ 4,5 м²/г, производства ООО «Сибтермохим» (Россия), получен методом электрического взрыва проводников.

Перед началом эксперимента было проведено исследование удельной поверхности ($S_{\text{уд}}$) материалов с помощью автоматического газоадсорбционного анализатора TriStar II (США), а также фазового состава и структурных параметров порошков TiO_2 на дифрактометре XRD-6000 на $\text{CuK}\alpha$ -излучении (США). Анализ фазового состава, размеров областей когерентного рассеяния (ОКР), внутренних упругих напряжений ($\Delta d/d$) проведен с использованием баз данных PDF 4+, а также программы полнопрофильного анализа POWDER CELL 2.4. В табл. 1 приводятся данные по исследованным образцам.

Исходя из размеров частиц, преимущественно содержащихся в каждом образце, далее по тексту образец 1 обозначается как наночастицы TiO_2 12 нм, а образец 2 – как микрочастицы TiO_2 175 нм.

Для проведения хемилюминесцентных реакций использовали люминол и сернокислое железо (Sigma).

Статистическая обработка. Полученные результаты статистически обрабатывались с помощью критерия Манна–Уитни с помощью пакета прикладных программ StatSoft Statistica 8.0. Статистическую значимость различия вычисляли при уровне значимости $p < 0,05$. Рисунки построены с использованием программы Microsoft Excel. На рис. 1–4 показана средняя арифметическая с ошибкой средней ($M \pm m$). Ошибка средней показана ограниченной вертикальной линией.

Т а б л и ц а 1

Характеристики используемых порошков TiO_2

Образец	$S_{уд}(BET)$ m^2/g <i>a</i>	Обнаруженные фазы <i>b</i>	Содержание фаз, об. % <i>b</i>	Размеры ОКР (δ_{50}), нм <i>b</i>	$\Delta d/d \cdot 10^{-3}$ <i>b</i>
1	95	TiO_2 – rutile	4	13	1,9
		TiO_2 – anatase	90	12	3,4
		TiO_2 – brookite	6	22	1,4
2	4,5	TiO_2 – rutile	97,4	175	0,2
		TiO_2 – anatase	1,0	15	2,6
		TiO_2 – brookite	1,6	12	2,0

Примечание. *a* – анализ выполнен старшим научным сотрудником, кандидатом химических наук О.А. Магаевым в Центре сорбционных и каталитических исследований ТГУ (г. Томск); *b* – анализ выполнен профессором, доктором физико-математических наук Е.П. Найденом в Центре материаловедения ТГУ (г. Томск).

Результаты исследования и обсуждение

Масса пристеночной слизи желудка. У контрольных животных масса пристеночной слизи желудка составляла $0,058 \pm 0,005$ г, у животных, получавших наночастицы TiO_2 , – $0,045 \pm 0,007$ г ($p < 0,05$ по сравнению с контролем), у животных, получавших микрочастицы TiO_2 , – $0,063 \pm 0,011$ г ($p < 0,05$ по сравнению с животными, получавшими наночастицы). Следовательно, масса пристеночной слизи желудка у крыс, получавших наночастицы TiO_2 , была самой низкой относительно групп сравнения. Снижение массы пристеночной слизи свидетельствует о нарушениях в процессах синтеза и деградации гликопротеинов пристеночного слизистого слоя, важнейшего защитного механизма желудка [15].

В результате нарушений в процессах биосинтеза гликопротеинов пристеночного слизистого слоя (изменение активности трансфераз) образуются так называемые незрелые гликопротеины, для которых характерны не полностью сформированные олигосахаридные цепочки, поэтому они не обеспечивают необходимого уровня межмолекулярных взаимодействий и гелеобразования. Эти биосинтетические нарушения становятся причиной несостоятельности защитной функции пристеночного слизистого слоя, нарушения целостности слизистой оболочки желудка и провоцируют развитие острой язвы, которая является симптоматическим поражением и может развиваться в том числе в результате воздействия токсических веществ [16]. Поэтому снижение массы пристеночной слизи желудка у крыс, получавших наночастицы TiO_2 , является важной характеристикой токсического действия наночастиц TiO_2 на организм.

Область эрозивного повреждения слизистой оболочки желудка. При макроскопическом обследовании слизистой оболочки желудка было установлено, что эрозивные повреждения были обнаружены у всех трех исследуемых групп животных: у контрольных этот показатель составлял $5,44 \pm 4,1$ мм² на одно животное, у крыс, получавших наночастицы TiO_2 , – $13,91 \pm 2,6$ мм² на одно животное ($p < 0,05$ по сравнению с контролем), у крыс, получавших микрочастицы TiO_2 , – $10,99 \pm 4,2$ мм² на одно животное.

Следовательно, у животных, получавших наночастицы TiO_2 , площадь области эрозивного повреждения в условиях наших экспериментов была максимальной. Описаны 3 последовательных типа поражения слизистой оболочки пищеварительной системы: кровоизлияния в слизистую оболочку, которые могут варьировать от мелких петехий до образования сливных полей; эрозии, характеризующиеся поверхностной деструкцией слизистой оболочки без проникновения в подслизистый слой; острые язвы, при которых округлый, «штампованный» дефект проникает до подслизистого и даже мышечного слоя стенки органов пищеварительной системы [17]. Обычно острые язвы пищеварительной системы существуют недолго и при благоприятном течении основного заболевания или, как в нашем случае, после устранения стрессорных факторов довольно быстро, в течение 1–2 недель, практически бесследно заживают. Если же токсическое воздействие приобретает затяжной характер, то течение острых язв у 10–12% больных осложняется кровотечением и перфорацией, причем в отличие от хронических язв значительно чаще наблюдается сочетание этих осложнений. Значительный по сравнению с контролем размер области эрозивного повреждения слизистой оболочки желудка крыс, получавших наночастицы TiO_2 , свидетельствует о токсическом характере воздействия этих наночастиц на слизистую оболочку желудка крыс при поступлении их в организм через желудочно-кишечный тракт.

Про- и антиоксидантная активность пристеночной слизи желудка.

Исследование индуцированной хемилюминесценции пристеночной слизи желудка показывает уровень свободных радикалов в данном объекте. В условиях наших опытов был получен максимальный уровень индуцированной хемилюминесценции пристеночной слизи желудка (и, следовательно, свободных радикалов) у животных, получавших наночастицы TiO_2 , достоверно отличающийся от контроля (рис. 1). Уровень индуцированной хемилюминесценции пристеночной слизи крыс, получавших микрочастицы TiO_2 , занимал промежуточное положение между контролем и уровнем индуцированной хемилюминесценции крыс, получавших наночастицы TiO_2 .

Антиоксидантная активность пристеночной слизи желудка при поступлении нано- и микрочастиц TiO_2 через желудочно-кишечный тракт изменялась соответственно состоянию индуцированной хемилюминесценции у групп сравнения. У животных, получавших наночастицы TiO_2 , этот показатель был наиболее высоким, а начиная с 4-й минуты реакции – и достоверно отличающимся от контроля (рис. 2). У животных, получавших микрочастицы TiO_2 , уровень антиоксидантной активности пристеночной слизи почти не отличался от контрольных значений.

Можно предположить, что высокий уровень антиоксидантной активности пристеночной слизи у крыс, получавших наночастицы TiO_2 , является процессом, сопряженным с высоким уровнем ее индуцированной хемилюминесценции. В составе пристеночной слизи желудка наиболее значимым компонентом являются гликопротеины. Эти макромолекулы, как и любые другие, могут обладать про- и антиоксидантными свойствами [18].

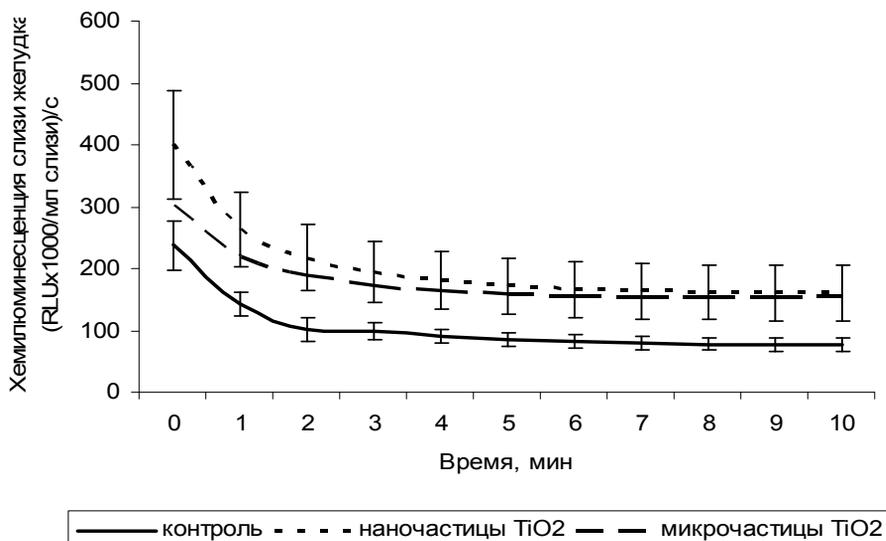


Рис. 1. Уровень индуцированной хемилюминесценции пристеночной слизи желудка у контрольных крыс и крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2

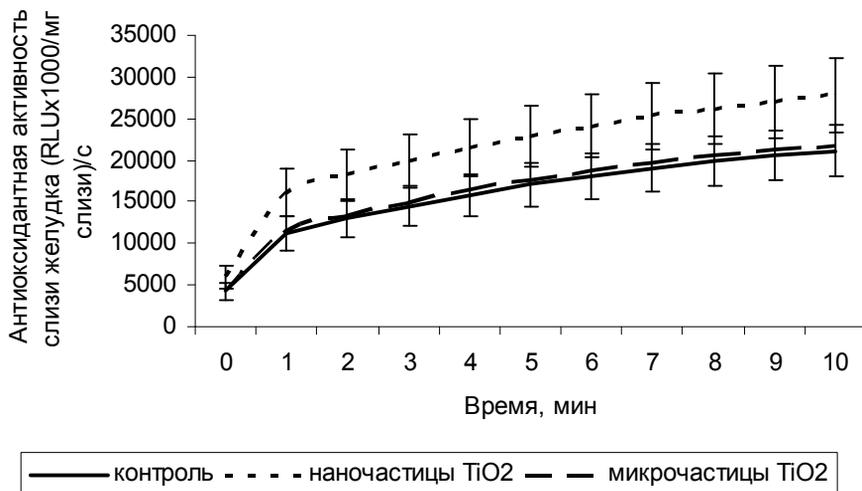


Рис. 2. Уровень антиоксидантной активности пристеночной слизи желудка у контрольных крыс и крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2

Ранее нами было обнаружено [19], что повышение уровня индуцированной хемилюминесценции в пристеночной слизи сопровождается нарушениями в строении олигосахаридной части молекул гликопротеинов и усилением процессов их деградации. В процессе деградации гликопротеинов происходит освобождение терминальных групп в моносахарах, которые становятся реакционно-способными и могут проявлять как про-, так и антиоксидантные свойства.

Таким образом, снижение массы пристеночной слизи, наибольшая площадь эрозивных повреждений, высокий уровень индуцированной хемилюминесценции и антиоксидантной активности пристеночной слизи свидетельствуют о значительных нарушениях защитной функции пристеночной слизи – важнейшего структурного элемента защитного слизистого барьера желудка у крыс, получавших наночастицы TiO_2 через желудочно-кишечный тракт.

Про- и антиоксидантная активность плазмы крови. Уровень индуцированной хемилюминесценции плазмы крови является интегральным показателем, характеризующим уровень свободных радикалов самого разного происхождения в плазме крови, в отличие от пристеночной слизи желудка, в которой источниками про- или антиоксидантной активности являются преимущественно молекулы гликопротеинов. Современные методы исследований позволяют выявлять наличие в биологических системах от 300 до 800 разных органических радикалов. Это могут быть радикалы липидов, белков и низкомолекулярных пептидов, нуклеиновых кислот, фенолов, неорганических молекул... Удачная классификация таких соединений предложена Ю.А. Владимировым, согласно которой все образующиеся в организме активные формы кислорода разделены на природные и чужеродные. Природные активные формы кислорода можно разделить на первичные, вторичные и третичные; среди причин появления чужеродных активных форм кислорода можно выделить 3 основных фактора: радиация, оптические излучения и ксенобиотики [18, 20]. Различные органические радикалы вступают во взаимодействия друг с другом, и поэтому общий уровень свободных радикалов в том или ином объекте не может быть их простой суммой. Интегральный уровень свободных радикалов отражают показания индуцированной хемилюминесценции, являющейся результатом взаимодействия всех активных форм кислорода между собой. Поэтому наиболее информативным в настоящее время методическим приемом считается не исследование уровня отдельных про- или антиоксидантных систем, а определение интегральной хемилюминесцентной активности объекта [21].

Полученные в условиях наших опытов результаты определения уровня индуцированной хемилюминесценции плазмы крови не выявили различий между всеми группами сравнения: в контроле и у крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2 (рис. 3). Это может быть связано именно с многообразием возможных взаимодействий между свободными радикалами различного происхождения.

Уровень антиоксидантной активности плазмы крови у крыс, получавших наночастицы TiO_2 , начиная с 5-й минуты реакции, достоверно ($p < 0,05$ по сравнению с контролем и животными, получавшими микрочастицы TiO_2) выше, чем у групп сравнения (рис. 4). Это может быть связано с тем, что в развитии антиоксидантных реакций у животных разных серий, получавших частицы TiO_2 разной степени дисперсности, участвуют различные механизмы. В этом случае можно предполагать, что поступление в организм наночастиц TiO_2 может вызвать развитие иных метаболических реакций, отличных от тех, которые развиваются при поступлении микрочастиц TiO_2 .

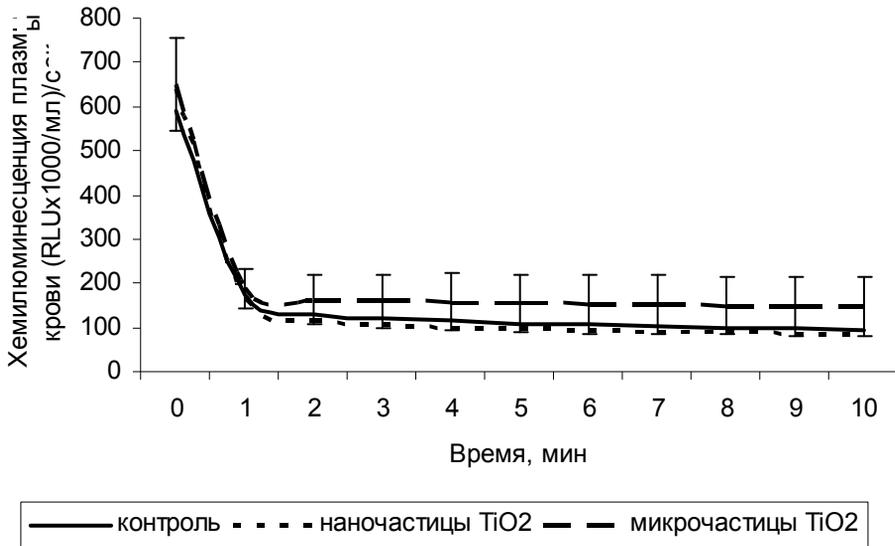


Рис. 3. Уровень индуцированной хемилюминесценции плазмы крови у контрольных крыс и крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2

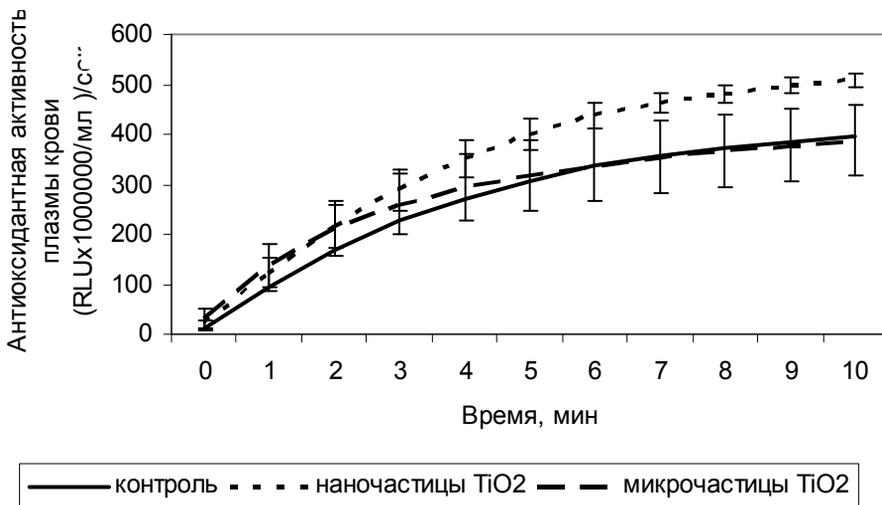


Рис. 4. Уровень антиоксидантной активности плазмы крови у контрольных крыс и крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2

В значительной части работ, посвященных биологическим эффектам TiO_2 , отмечается важная роль развивающихся окислительных повреждений [22–25]. В условиях наших опытов, наоборот, было показано развитие антиоксидантных реакций в плазме крови. Предполагается, что это может быть проявлением компенсаторной реакции организма на поступление наночастиц TiO_2 .

Общие биохимические параметры сыворотки крови. Для того чтобы попытаться оценить состояние метаболических и физиологических процессов в организме крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2 , оценивали состояние общих биохимических параметров сыворотки крови. В предыдущих исследованиях было показано, что нано- или микрочастицы TiO_2 , поступающие в организм через желудочно-кишечный тракт, не накапливались в исследуемых тканях: крови, мозге, селезенке, печени, почках, жировой ткани. Через 24 ч после скармливания крысам частиц TiO_2 в дозе 250 мкг/кг в сутки количество титана во всех исследованных органах не отличалось от контрольной группы и находилось на уровне физиологической нормы, что свидетельствует об отсутствии биоаккумуляции TiO_2 в условиях опыта. Однако физиологическое влияние нано- или микрочастиц TiO_2 могло иметь иницирующий характер, поэтому состояние отдельных органов или систем исследовалось по биохимическим параметрам в сыворотки крови (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

**Биохимические показатели в крови крыс,
получавших нано- или микрочастицы TiO_2 ($M \pm m$, $n=10$)**

Показатель	Группа крыс		
	Контроль	Наночастицы TiO_2	Микрочастицы TiO_2
Глюкоза, мМ/л	5,36±0,09	5,54±0,012	5,33±0,07
Холестерин, мМ/л	1,76±0,15	1,46±0,19	1,36±0,12
Альбумины, г/л	42,51±1,63	40,89±1,15	42,9±1,04
Аспаргатаминотрансфераза, Ед/л	24,67±2,59	29,67±5,67	18,64±3,63
Аланинаминотрансфераза, Ед/л	22,45±7,29	17,49±3,3	18,93±1,68
Билирубин, мкМ/л	3,74±0,99	2,94± 0,83	3,06±0,5
Креатинфосфокиназа, Ед/л	351,23±57,98	324,86±47,4	413,88±69,44
Изофермент креатинфосфокиназы, Ед/л	40,64±10,28	34,33±9,0	44,88±10,0
Мочевина, мМ/л	8,37±0,38	8,61±0,22	8,88±0,18
Креатинин, мкМ/л	50,05±1,45	49,0±2,1	52,25±2,0
Мочевая кислота, мкМ/л	261,91±15,16	295,0±19,83	274,38±11,87
Щелочная фосфатаза, Ед/л	1282,0±104,16	1512,0±169,56	1425,1±132,83
Лактатдегидрогеназа, Ед/л	487,84±63,43	444,24±59,31	330,1±39,78*

* $p < 0,05$.

Результаты оценки биохимических параметров сыворотки крови показали, что почти во всех группах сравнения не установлено достоверных различий между контролем и группами крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2 (см. табл. 1), за исключением снижения уровня лактатдегидрогеназы у крыс, получавших микрочастицы TiO_2 . Это означает, что не было обнаружено изменений в уровне обмена белков, липидов и углеводов (глюкоза, холестерин, альбумины) у крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2 , по сравнению с контрольной группой.

Билирубин образуется в клетках ретикулоэндотелиальной системы печени в результате катаболизма геминовой части гемоглобина и других гемсодер-

жащих белков, аланинаминотрансфераза синтезируется внутриклеточно в печени и попадает в кровь в результате цитолиза при повреждениях печени. Отсутствие изменений этих параметров у крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2 , по сравнению с контрольной группой, свидетельствует об отсутствии повреждений печеночной ткани, которая наиболее часто страдает при токсикозах.

Аспартатаминотрансфераза синтезируется внутриклеточно в тканях миокарда и печени, широко используется для диагностики их повреждений. Отсутствие изменений содержания аспартатаминотрансферазы и ее соотношения с аланинаминотрансферазой характеризует отсутствие нарушений в сердечной мышце и печени у крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2 , по сравнению с контрольной группой. В отличие от наших данных в работе [26] показано увеличение соотношения аспартатаминотрансферазы/аланинаминотрансферазы в сыворотке крови у мышей после введения наночастиц TiO_2 . Это может быть связано или с видовыми особенностями экспериментальных животных и/или с разницей в процедуре постановки опыта: в работе [26] опыты были поставлены на мышах, однократно внутрижелудочным зондом вводилась очень большая доза наночастиц TiO_2 (5 г /1 кг массы тела).

Креатинфосфокиназа характеризует состояние мышечной ткани, в том числе миокарда, а ее изофермент находится преимущественно в сердечной мышце, отсутствие изменений этих показателей у крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2 , по сравнению с контрольной группой, свидетельствует об отсутствии воздействия TiO_2 на эти системы в условиях нашего эксперимента.

Лактатдегидрогеназа участвует в процессе окисления глюкозы и образовании молочной кислоты, содержится почти во всех органах и тканях, особенно в мышцах. В условиях гипоксии лактатдегидрогеназа накапливается, вызывает нарушение тканевого дыхания. У контрольных животных и крыс, получавших наночастицы TiO_2 , этот показатель в крови не различается. У крыс, получавших микрочастицы TiO_2 , он снижается по сравнению с контролем, следовательно, тканевое дыхание у этих животных усиливается по сравнению с группами сравнения. В исследованиях [1] было получено увеличение активности лактатдегидрогеназы в лаважной жидкости после интратрахеального воздействия наночастиц TiO_2 . Авторы считают, что адаптивный ответ легочной ткани не компенсирует токсическое действие наночастиц TiO_2 .

Концентрация мочевины и креатинина в плазме крови отражает функцию гломерулярного аппарата почек. Не установлено снижение этих показателей, что свидетельствует об отсутствии патологических процессов в почках крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2 , по сравнению с контрольными животными.

Увеличение уровня мочевой кислоты в плазме крови происходит при нарушении функции почек и приводит к повреждениям различных органов и тканей. Достоверных изменений этого показателя в условиях нашего эксперимента не обнаружено, однако наблюдается тенденция к увеличению его у крыс, получавших наночастицы TiO_2 .

Щелочная фосфатаза участвует в обмене фосфора, самый высокий ее уровень – в костной ткани. Анализ крови на щелочную фосфатазу проводят для диагностики заболеваний костной системы, печени, желчевыводящих путей и почек. Отсутствие изменения этого показателя у экспериментальных животных, по сравнению с контрольными, показывает отсутствие изменений в этих системах.

Следовательно, биохимические показатели в крови крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2 , демонстрируют отсутствие значимых нарушений в основных исследованных системах организма в условиях нашего эксперимента. Однако нельзя считать доказанным отсутствие токсичного биологического эффекта TiO_2 на исследованные системы. Некоторые авторы в своих исследованиях получали развитие легочного фиброза, проявления нефротоксичности, поражения печени и проявления нарушений миокарда [27]. Интересно, что в этой же работе было показано отсутствие патологических изменений в сердце, лёгком, яичнике и тканях селезёнки на гистологических срезах [27]. Возможно, различия в результатах исследований связаны с различными условиями опытов и различными физико-химическими характеристиками исследованных наночастиц TiO_2 . Отсутствие значимых нарушений в биохимических показателях крови в условиях нашего эксперимента может также демонстрировать то, что были исследованы далеко не все системы и функции организма. Например, серьезные нарушения состояния пристеночного слизистого слоя и слизистой оболочки желудка, впервые установленные в условиях нашего опыта, показывают один из начальных этапов возможного развития метаболических нарушений, которые могут реализоваться при более продолжительном поступлении наночастиц. Возможно, необходимо в дальнейшем более детально изучить функционирование отдельных систем с тем, чтобы определить пределы токсических или компенсаторных реакций.

Таким образом, проведенные исследования показали, что после физиологического поступления наночастиц TiO_2 (δ_{50} 12 нм, $S_{уд}$ 95 м²/г) в дозе 250 мг/кг массы тела через желудочно-кишечный тракт наблюдаются нарушения в процессах образования и деградации пристеночного слизистого слоя желудка, усиление эрозивных повреждений слизистой оболочки желудка, увеличение про- и антиоксидантной активности пристеночной слизи. Эти процессы приводят к развитию токсического влияния наночастиц TiO_2 на функциональную активность защитного слизистого барьера и влияют на функционирование желудка и пищеварительного тракта в целом. Нарушение барьерной функции пристеночного слизистого слоя может стать причиной проникновения наночастиц TiO_2 во внутреннюю среду организма и инициировать развитие нарушений в функционировании различных органов и систем. При исследовании хемилюминесцентных параметров плазмы крови было показано, что отсутствуют изменения в уровне индуцированной хемилюминесценции плазмы крови, которая характеризует количество свободных радикалов, при поступлении в организм как нано-, так и микрочастиц TiO_2 . Уровень антиоксидантной активности плазмы крови, начиная с 5-й минуты реакции, повышался у крыс, получавших наночастицы TiO_2 ,

тогда как у крыс, получавших микрочастицы TiO_2 , этот показатель оставался на уровне контрольных значений. Это может быть проявлением компенсаторной реакции организма на поступление именно наночастиц TiO_2 . Биохимические показатели в крови крыс, получавших нано- или микрочастицы TiO_2 , демонстрируют отсутствие значимых нарушений в исследованных системах организма в условиях нашего эксперимента.

Литература

1. Afaq F., Abidi P., Matin R., Rahman Q. Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide // *J. Appl. Toxicol.* 1998. № 18. P. 307–312.
2. Warheit D.B., Webb T.R., Sayes C.M. et al. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO_2 rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon size and surface area // *Toxicol. Sci.* 2006. Vol. 91, № 1. P. 227–236.
3. Wang J., Zhou G., Chen C., Yu H. et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration // *Toxicology Letters.* 2007. Vol. 168, is. 2. P. 176.
4. Chen J., Dong X., Zhao J., Tang G. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection // *J. Appl. Toxicol.* 2009. Vol. 29, № 4. P. 330–337.
5. Zhang R., Niu Y., Li Y. et al. Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2010. Vol. 30, № 1. P. 52–60.
6. Boffetta P., Soutar A., Cherrie J.W. et al. Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe // *Cancer Causes Control.* 2004. № 15. P. 697–706.
7. Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L. et al. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats // *Arch. Toxicol.* 2008. V. 82, № 3. P. 151–157.
8. Liao C.-M., Chiang Y.-H., Chio C.-P. Assessing the airborne titanium dioxide nanoparticle-related exposure hazard at workplace // *J. Hazard. Mater.* 2009. Vol. 162, № 1. P. 57–65.
9. Oberdörster G., White R., Rabin R. et al. Space Exploration and Toxicology: A New Frontier // *Fundam. Appl. Toxicol.* 1994. № 22. P. 61–171.
10. Warheit D.B., Webb T.R., Sayes C.M. et al. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO_2 rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon size and surface area // *Toxicol. Sci.* 2006. Vol. 91, № 1. P. 227–236.
11. Colvin V.L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21, № 10. P. 1166–1170.
12. Owen R., Depledge M. Nanotechnology and the environment: Risks and rewards // *Mar. Pollut. Bull.* 2005. Vol. 50, № 6. P. 609–612.
13. Salomon M. Risks of synthetic nanomaterials for human health // *Umweltmedizin in Forschung und Praxis.* 2009. Vol. 14, № 1. P. 7–22.
14. Кривова Н.А., Дамбаев Г.Ц., Хитрихеев В.Е. Надэпителиальный слизистый слой желудочно-кишечного тракта и его функциональное значение. Томск: МГП «Раско», 2002. 316 с.
15. Кривова Н.А., Селиванова Т.И., Заева О.Б. Видовые особенности состава надэпителиального слизистого слоя пищеварительного тракта у крыс и мышей // *Физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 1994. Т. 80, № 8. С. 118–123.
16. Бобров О.Е. Острые язвы пищеварительной трубки. Ч. 1. URL: www.critical.ru/actual/bobrov/acute_ulcers_1.htm
17. Хохлая В.П., Саенко В.Ф., Доценко В.П. Клиника и лечение острых язв пищеварительного канала. Киев: Здоровье, 1989. 167 с.

18. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.
19. Кривова Н.А., Заева О.Б., Лантева Т.А., Светличный В.А. Исследование взаимосвязей между составом гликопротеинов и антиоксидантной активностью пристеночной слизи желудочно-кишечного тракта // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94, № 11. С. 1316–1334.
20. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образовательный журнал. 2000. № 12. С. 13–19.
21. Levin G.J. The antioxidant system of the organism. Theoretical basis and practical consequences // Med. Hypotheses. 1994. Vol. 42, № 4. P. 269–275.
22. Konaka R., Kasahara E., Dunlap W.C. et al. Ultraviolet irradiation of titanium dioxide in aqueous dispersion generates singlet oxygen // Redox Rep. 2001. № 6. P. 319–325.
23. Gurr J.-R., Wang A. S.S., Chen C.-H., Jan K.-Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells // Toxicology. 2005. Vol. 213, № 1–2. P. 66–73.
24. Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N.J.F., Jha A.N. Hydroxyl radicals (OH[•]) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells // Mutat. Res.-Fund. Mol. M., 2008. Vol. 640, № 1–2. P. 113.
25. Zhang J., Johnson P.C., Popel A.S. Effects of erythrocyte deformability and aggregation on the cell free layer and apparent viscosity of microscopic blood flows // Microvasc. Res. 2009. Vol. 77, № 3. P. 265–272.
26. Wang J., Zhou G., Chen C. et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration // Toxicol. Lett. 2007. Vol. 168, № 2. P. 176–180.
27. White R., Rabin, Clarkson T., Irons R. et al. Space Exploration and Toxicology: A New Frontier // Fundam. Appl. Toxicol. 1994. № 22. P. 161–171.

Поступила в редакцию 21.01.2011 г.

**Natalia A. Krivova, Olga B. Zaeva, Marina Ju. Khodanovich, Olga A. Karelina,
Elizaveta V. Gul, Anna E. Zelenskaja**

Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University, Tomsk, Russia

CONDITION OF THE STOMACH MUCOUS COAT, PRO- AND ANTIOXIDANT ACTIVITY, AND BIOCHEMICAL BLOOD INDICES IN RATS FED WITH NANO- OR MICROPARTICLES OF TITANIUM DIOXIDE

In chronic experiments on rats, the biological action of nano- or microparticles of titanium dioxide (TiO₂) was studied upon their supply through gastrointestinal tract. For 7 days, test animals received with food 50 mg per rat (250 mg per kg of bodyweight) of a TiO₂ powder. A procedure of titanium dioxide feeding was arranged in such a way as to provide the controlled and physiological supply of TiO₂ nano- or microparticles into the body: every day at 10:00 a.m. the rats were placed into individual cages and given TiO₂ powder with an attractive food (20 cm² sized pan-cake). The animals stayed in the individual cages until they ate up their food. Animals of the control series were also placed into individual cages, but received the attractive food only.

The study revealed that physiological supply of TiO₂ nanoparticles (δ₅₀ 12 nm, Sspecif 95 m²/g) through gastrointestinal tract is accompanied by abnormalities in the formation and degradation of parietal mucous layer of the stomach, augmentation of erosion in the stomach mucous coat, and enhanced pro- and antioxidant activity of parietal mucus. These processes give rise to a toxic impact of TiO₂ nanoparticles on the

functional activity of protective mucous barrier and affect the functioning of stomach and the entire digestive tract. Disturbance of the barrier function of parietal mucous layer may allow TiO₂ nanoparticles to penetrate into internal environment of the body and initiate derangement in the functioning of various organs and systems. Investigation of blood plasma chemiluminescence parameters demonstrated that supply of TiO₂ nano- or microparticles into the body does not change the level of induced chemiluminescence in blood plasma, which characterizes the amount of free radicals. Antioxidant activity in blood plasma of rats fed with TiO₂ nanoparticles increased starting from the 5th minute of the reaction, whereas rats fed with TiO₂ microparticles retained the control level of antioxidant activity. This may result from a compensatory reaction of the organism to supplying exactly the nanoparticles of titanium dioxide. Biochemical blood indices in rats receiving TiO₂ nano- or microparticles demonstrate the absence of significant disturbances in the tested systems of the body under the conditions of our experiment.

Key words: nano- or microparticles of titanium dioxide (TiO₂); rats; gastrointestinal tract; pro- and antioxidant activity; biochemical blood indices.

Received January 21, 2011