

УДК 612.084, 57.04

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА НА РЕДОКС-СООТНОШЕНИЕ В ОТДЕЛАХ МОЗГА И ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС

Кривова Н.А., Заева О.Б., Григорьева В.А., Ходанович М.Ю.

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» Минобрнауки России, Томск, e-mail: nakri@res.tsu.ru

Целью нашего исследования явилось изучение редокс-соотношения как показателя окислительно-восстановительных процессов в тканевых гомогенатах отделов мозга и плазме крови крыс после перорального поступления нано- и микрочастиц TiO_2 . Использовали метод люминолзависимой хемилуминесценции для исследования общей антиоксидантной активности и свободных радикалов. Их соотношение определяли как редокс-соотношение. Было установлено дозозависимое увеличение редокс-соотношения в отделах мозга, которое свидетельствует о том, что наночастицы TiO_2 проникают через гематоэнцефалический барьер. В мозжечке, коре лобной доли и таламическом мозге увеличение редокс-соотношения после введения наночастиц TiO_2 в дозе 400 мг/кг значительно выше, чем в обонятельной луковице, заднем и среднем мозге, что свидетельствует о разной степени реакции отделов мозга. Введение микрочастиц TiO_2 также вызывает повышение редокс-соотношения в отделах мозга, что свидетельствует о том, что TiO_2 при любых структурных параметрах может обладать признаками нейротоксичности. Дозозависимое увеличение редокс-соотношения после введения наночастиц TiO_2 и увеличение этого показателя после введения микрочастиц TiO_2 было установлено и в плазме крови. Предполагается, что увеличение редокс-соотношения в отделах мозга связано с нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера после введения TiO_2 и деградацией полисахаридных элементов внеклеточного матрикса.

Ключевые слова: наночастицы, TiO_2 , редокс-соотношение, отделы мозга, плазма крови, крысы

EFFECT OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ON THE REDOX RATIO IN RAT BRAIN PARTS AND BLOOD PLASMA

Krivova N.A., Zayeva O.B., Grigoryeva V.A., Khodanovich M.Y.

Institute of Biology and Biophysics, Tomsk State University, Tomsk, e-mail: nakri@res.tsu.ru

Our work was aimed to study the redox ratio, which reflects the oxidation-reduction processes in tissue homogenates of rat brain parts and blood plasma after physiological oral (with attractive food) introduction of TiO_2 nano- and microparticles. 20-nm TiO_2 nanoparticles were introduced at a dose of 200 mg/kg and 400 mg/kg, and 175-nm TiO_2 microparticles at a dose of 200 mg/kg. The luminol-dependent chemiluminescence method was used to estimate the general antioxidant activity and the concentration of free radicals. Their ratio was considered as the redox ratio. A dose-dependent increase of the redox ratio in brain parts has been revealed, which indicates that TiO_2 nanoparticles penetrate the blood-brain barrier. In cerebellum, frontal lobe cortex and thalamic brain, an increase in redox ratio after the introduction of TiO_2 nanoparticles is much more pronounced as compared to that in olfactory bulb, metencephalon and mesencephalon, which indicates that the brain parts respond with different intensity. The introduction of TiO_2 microparticles also increases the redox ratio in brain parts, thus testifying that TiO_2 may have signs of neurotoxicity at any structural parameters. A dose-dependent increase in redox ratio after the introduction of TiO_2 nano- and microparticles was observed also in blood plasma. Supposedly, the increase of redox ratio in brain parts may be caused by dysfunction of blood-brain barrier permeability after TiO_2 introduction and by degradation of polysaccharide elements of extracellular matrix.

Keywords: nanoparticles, TiO_2 , redox ratio, brain parts, blood plasma, rats

Наночастицы TiO_2 повсеместно используются благодаря высокой светоотражающей способности. TiO_2 в виде пищевой добавки Е 171 разрешен к применению в дозе до 1% от общей массы продукта. Поэтому пероральное поступление TiO_2 в организм с различными пищевыми и лекарственными продуктами, где он используется в качестве вспомогательного вещества для улучшения потребительских свойств, может быть не контролируемый. На сегодняшний день полученные данные о токсичности наноразмерных материалов не позволяют определить нормативы их использования, а накопленный опыт показывает, что каждый наноматериал должен изучаться индивидуально с учетом его размера, формы, структуры поверхности, агрегатного состо-

яния, химического состава, растворимости и целого ряда других факторов. Поэтому в настоящее время данные по воздействию наночастиц на здоровье человека и экосистемы ограничены [2, 3].

Целью нашего исследования явилось изучение редокс-соотношения в тканевых гомогенатах отделов мозга и плазме крови крыс после перорального поступления наночастиц TiO_2 . Редокс-соотношение определяется как интегральный показатель окислительно-восстановительных процессов в ткани, характеризующий функциональную активность и уровень окислительного стресса.

Материалы и методы исследования

Хронические опыты были поставлены на 40 крысах-самцах Вистар. Животные содержались на стан-

дартном рационе, в изолированном вентилируемом помещении, в котором поддерживалась температура $20 \pm 2,0^\circ\text{C}$, влажность воздуха 60% и световой режим 12/12.

После карантинной выдержки крысы в течение 7 дней перорально получали частицы диоксида титана специально разработанным физиологичным способом – ежедневно в 10 часов утра каждую крысу пересаживали из общей клетки в индивидуальный домик, нано- или микрочастицы TiO_2 заворачивали в привлекательный корм, крыса оставалась в индивидуальном домике до полного поедания корма (обычно – до 30 минут), затем животных пересаживали обратно в общую клетку. Таким образом обеспечивалось физиологичное и контролируемое пероральное поступление нано- или микрочастиц TiO_2 . Были использованы наночастицы TiO_2 , полученные плазмахимическим методом (производство MACH I, USA). Перед началом хронического эксперимента был выполнен контроль удельной поверхности материалов с помощью автоматического газо-адсорбционного анализатора TriStar II, а также фазового состава и структурных параметров порошков TiO_2 на дифрактометре XRD-6000 на $\text{CuK}\alpha$ -излучении. Были использованы две дозы наночастиц TiO_2 (по 50 и 100 мг/крысу, что соответствует дозам 200 и 400 мг/кг) и микрочастицы TiO_2 в качестве химического контроля. Животные были разделены на 4 группы, в каждой группе по 10 крыс: 1 группа «контроль» – биологический контроль; 2 группа «50 мг нано» получала наночастицы TiO_2 20 нм, $S_{\text{уд}} 77 \text{ м}^2/\text{г}$ в дозе 200 мг/кг; 3 группа «100 мг нано» получала наночастицы TiO_2 20 нм, $S_{\text{уд}} 77 \text{ м}^2/\text{г}$ в дозе 400 мг/кг; 4 группа «микро» получала микрочастицы TiO_2 175 нм, $S_{\text{уд}} 4,5 \text{ м}^2/\text{г}$ в дозе 200 мг/кг.

После завершения хронического эксперимента крыс взвешивали, измеряли температуру ядра тела и проверяли физическую выносливость (время повисания на металлической сетке с размером ячейки $1,5 \times 1,5 \text{ мм}$, среднее значение из трех попыток). Перед умерщвлением крыс подвергали легкому эфирному ингаляционному наркозу. Из бедренной вены собирали кровь, готовили плазму крови. Декапитация проводилась мгновенно с помощью гильотины. Сразу после декапитации выделяли головной мозг, из которого выделяли следующие отделы: обонятельная луковица, мозжечок, задний мозг, кора лобной доли, средний мозг и таламический мозг. Из выделенных отделов мозга брали образцы массой до 150 мг, взвешивали, помещали в 1 мл охлажденного физиологического раствора и хранили до дня анализа при температуре -20°C . Образцы плазмы крови также хранили при -20°C . В день анализа образцы тканей размораживали, доводили физиологическим раствором до концентрации 50 мг ткани/мл, гомогенизировали. Гомогенаты центрифугировали, полученные супернатанты использовали для определения антиоксидантов и оксидантов в каждой исследованной ткани.

Для проведения хемилюминесцентного анализа антиоксидантов и оксидантов использовался двухкюветный хемилюминесцентный высокоточный разрешающий способ Lumat LB9507 (Berthold Technologies) с диапазоном спектральной чувствительности в интервале длин волн между 390 и 620 нм. Интенсивность хемилюминесценции (CL) регистрируют в единицах RLU (relative light units). Время измерения интенсивности люминолзависимой CL составляет 5 минут. Антиоксидантную активность измеряли по

принципу гашения интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции (CL) в радикалопродуцирующей системе после добавления биологической пробы [6]. Радикалопродуцирующая система содержит в 1 мл H_2O : 30 мкл 0,01 М раствора люминола в фосфатном буфере, 20 мкл 0,05 М раствора FeSO_4 и 10 мкл 0,1 М H_2O_2 . По 1 мл радикалопродуцирующей системы добавляли в две кюветы Lumat LB9507, затем в первую кювету добавляли 10 мкл H_2O , во вторую кювету добавляли 10 мкл супернатанта исследуемой пробы. Проводили измерение интенсивности CL в 1-й и 2-й кювете в течение 5 минут. По разнице интенсивности CL радикалопродуцирующей системы (1-я кювета) и интенсивности CL радикалопродуцирующей системы с добавлением супернатанта исследуемой пробы (2-я кювета), строили кривую интенсивности CL, характеризующей общую антиоксидантную активность (TAR). Светосумму (Sm) CL TAR определяли как площадь под кривой с помощью Microsoft Excel. Оксиданты (общий пул активных радикалов) (ROS) определяли по принципу активированной люминолом хемилюминесценции [3] в тех же условиях CL. Система для измерения ROS содержит в 1 мл: 30 мкл 0,01 М раствора люминола в фосфатном буфере. 1 мл системы помещали в кювету Lumat LB9507 и добавляли 10 мкл супернатанта исследуемой пробы, измерение интенсивности CL проводили в течение 5 минут. После построения кривой интенсивности CL, характеризующей ROS, определяли Sm CL ROS как площадь под кривой с помощью Microsoft Excel. Редокс соотношение определяли как частное от деления Sm CL TAR на Sm CL ROS в одной пробы.

Статистический анализ проводился с использованием пакета программ Statistica 6.0 для непараметрических выборок. Значения $p < 0,05$ считались значимыми.

Результаты исследования и их обсуждение

Масса тела и температура ядра тела после завершения эксперимента не имела различий у контрольных и опытных животных. Физическая выносливость у крыс серии «50 мг нано» была снижена в 2 раза по сравнению с животными групп сравнения.

Редокс-соотношение во всех отделах мозга контрольных животных составляло от 1,5 в обонятельной луковице до 5,3 в мозжечке (рис. 1). Следовательно, у контрольных животных в отделах мозга уровень антиоксидантной активности превышал уровень активных форм кислорода. После введения наночастиц TiO_2 в дозе 50 мг/крысу наблюдается увеличение редокс соотношения во всех отделах, кроме среднего и заднего мозга. Максимальное увеличение редокс соотношения отмечено в коре лобной доли. После введения наночастиц TiO_2 в дозе 400 мг/кг редокс-соотношение увеличивается как по сравнению с контролем (во всех отделах мозга), так и по сравнению с группой, получавшей 200 мг/кг (во всех отделах, кроме обонятельной луковицы и заднего мозга). В мозжечке, коре лобной

доли и таламическом мозге этот показатель после введения наночастиц TiO_2 в дозе 400 мг/кг составляет от 50 до 76 единиц, что значительно выше, чем в других отделах, и свидетельствует о разной степени реакции отделов мозга. После введения микрочастиц TiO_2 редокс-соотношение также увеличивается по сравнению с контролем,

наибольшее увеличение отмечено в таламическом мозге (рис. 1). Установленное дозозависимое увеличение редокс-соотношения в отделах мозга свидетельствует о том, что наночастицы TiO_2 проникают через гематоэнцефалический барьер и вызывают повреждения на субклеточном, клеточном и тканевом уровнях.

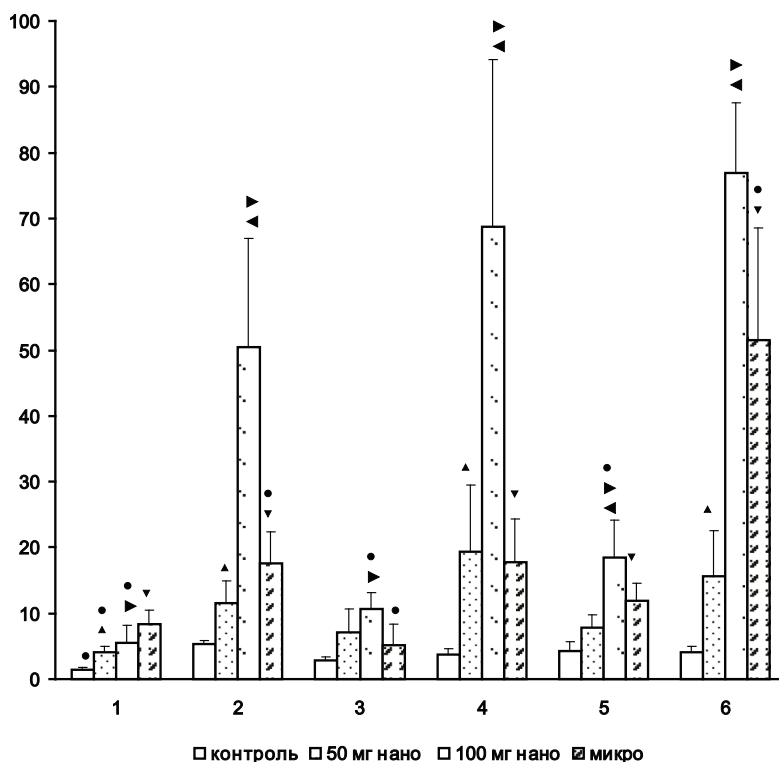


Рис. 1. Редокс-соотношение в отделах мозга крыс:

1 – обонятельная луковица, 2 – мозжечок, 3 – задний мозг, 4 – коры лобной доли, 5 – средний мозг, 6 – таламический мозг) в контроле, при введении наночастиц TiO_2 в дозе 200 мг/кг (50 мг nano), при введении наночастиц TiO_2 в дозе 400 мг/кг (100 мг nano), при введении микрочастиц TiO_2 (микро).

- – ($p < 0,05$) по отделам мозга внутри группы по отношению к коре лобной доли;
- ▲ – ($p < 0,05$) контроль и 50 мг nano; ► – ($p < 0,05$) контроль и 100 мг nano;
- ▼ – ($p < 0,05$) контроль и микро; ◄ – ($p < 0,05$) 50 мг nano и 100 мг nano

Разрушение гематоэнцефалического барьера у крыс было показано при воздействии наночастиц TiO_2 диаметром 10 и 20 нм [5], что соответствует диаметру наночастиц, использованных в данном исследовании. Одним из элементов гематоэнцефалического барьера является внеклеточный матрикс [9]. Компоненты внеклеточного матрикса тканеспецифичны, в мозге установлены различные формы специфичных протеогликанов (агреган, агрин, нейрокан, бигликан, декорин и другие), гликопротеинов (рилин, тенасцин), различные формы коллагенов, фибронектинов и ламининов, экспрессирующиеся только в головном мозге. Структуры внеклеточного матрикса мозга постоянно обновляются, установлены ферменты нейронов, контролируемые эти процессы

[8]. Предполагается, что высокий уровень редокс соотношения в отделах мозга после введения наночастиц TiO_2 свидетельствует об усилении деградации структур внеклеточного матрикса и вызванного этим механизмом разрушении гематоэнцефалического барьера. Поскольку введение микрочастиц TiO_2 также вызывает повышение редокс соотношения в отделах мозга, то можно сделать вывод о том, что TiO_2 при исследованных структурных параметрах может обладать признаками нейротоксичности.

В плазме крови также было показано дозозависимое увеличение редокс-соотношения после введения наночастиц TiO_2 в дозе 200 и 400 мг/кг и увеличение данного показателя после введения микрочастиц TiO_2 (рис. 2).

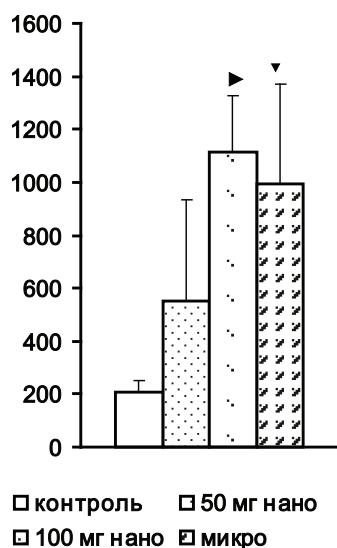


Рис. 2. Редокс-соотношение в плазме крови крыс в контроле, при введении наночастиц TiO_2 в дозе 200мг/кг (50 мг нано), при введении наночастиц TiO_2 в дозе 400 мг/кг (100 мг нано), при введении микрочастиц TiO_2 (микро), ▲ – ($p < 0,05$) контроль и 100 мг нано; ▼ – ($p < 0,05$) контроль и микро

Высокие показатели редокс-соотношения в плазме крови могут определяться тем, что уровень свободных радикалов в плазме очень низкий, возможно, в связи с присутствием низкомолекулярных антиоксидантов в плазме. Одним из механизмов повышения антиоксидантной активности является деградация макромолекул. W. Dröge [4] описывает механизм высокой антиоксидантной активности, который обеспечивается продуктами деградации протеинов. Аминокислоты являются слабыми поглотителями свободных радикалов, но за счет высокой внутриклеточной концентрации вносят большой вклад в общую антиоксидантную активность. В поглощении радикалов участвуют также реакционноспособные продукты перекисного окисления липидов, которые определяются как продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой [7]. Предполагается еще один тип поглотителей радикалов – продукты деградации гликопротеинов и протеогликанов. Структура гликопротеинов и протеогликанов и их высокая адгезивная способность обеспечивается межмолекулярными взаимодействиями между олиго- или полисахаридными цепочками моносахаров. Даже их частичная деградация освобождает огромное число радикалов на терминальных участках полисахаридных цепочек и обеспечивает их высокую способность улавливать радикалы. Следовательно, усиление деградации макромолекул проявляется как усиление антиоксидантной активности системы и приводит к повышению редокс-соотношения.

Таким образом, пероральное введение наночастиц TiO_2 вызывает дозозависимое увеличение редокс-соотношения как в отделах мозга, так и в плазме крови крыс. Введение микрочастиц TiO_2 также увеличивает редокс-соотношение в исследованных отделах мозга и плазме. Предполагается, что увеличение редокс-соотношения в отделах мозга связано с нарушением проницаемости гематоэнцефалического барьера и деградацией полисахаридных элементов внеклеточного матрикса.

Исследование было выполнено в рамках реализации Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы Минобрнауки России и поддержано грантом в форме субсидии по соглашению № 14.В37.21.0123 от 27 июля 2012 г.

Список литературы

1. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биол. химии. – 2009. – Т.49. – С. 341–388.
2. Проданчук М.Г., Балан Г.М. Наночастицы диоксида титана и их потенциальный риск для здоровья и окружающей среды // Совр. пробл. токсикологии. – 2011. – № 4. – С. 11–27.
3. Хамидулина Х.Х., Давыдова Ю.О. Международные подходы к оценке токсичности и опасности наночастиц и наноматериалов // Токсикол. вестник. – 2011. – № 6. – С. 53–57.
4. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol. 82. – P. 47–95.
5. Liu Y., Xu Z., Li X. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in rat neuroglia cells // *Brain Injury.* – 2013. – Vol. 27, № 7–8. – P. 934–939.
6. Llesuy S., Evelson P., Campos A.M., Lissi E. Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. A critical review // *Biol. Res. Santiago.* – 2001. – Vol. 34, 2: URL: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602001000200009> (дата обращения 18.07.2013).
7. Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers // *Biofactors.* – 2008. – Vol. 34. – P. 171–180.
8. Novak U., Kaye A.H. Extracellular matrix and the brain: components and function // *J. Clin. Neurosci.* – 2000. – Vol. 7. – P. 280–290.
9. Rauch U. Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain // *Cell Mol. Life. Sci.* – 2004. – Vol. 61. – P. 2031–2045.

References

1. Vladimirov Ju.A., Proskurina E.V. *Biochemistry (Moscow)*, 2009, Vol. 74, no. 13, p. 1545–1566.
2. Prodanchuk M.G., Balan G.M. *Sovr. probl. toksikologii*, 2011, no.4, p. 11–27.
3. Hamidulina H.H., Davydova Ju.O. *Toksikol. vestnik*, 2011, no.6, p. 53–57.
4. Dröge W. *Physiol.Rev.*, 2002, Vol. 82, p.47–95.
5. Liu Y., Xu Z., Li X. *Brain Injury*, 2013, Vol. 27, no. 7–8, p. 934–939.
6. Llesuy S., Evelson P., Campos A.M., Lissi E. *Biol. Res. Santiago*, 2001, Vol. 34, 2. Available at: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602001000200009> (accessed 18/07/2013).
7. Niki E. *Biofactors*, 2008, Vol. 34, pp. 171–180.
8. Novak U., Kaye A.H. *J. Clin. Neurosci.*, 2000, Vol. 7, pp. 280–290.
9. Rauch U. *Cell Mol. Life. Sci.*, 2004, Vol. 61, pp. 2031–2045.

Рецензенты:

Суходоло И.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой морфологии и общей патологии Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск;

Плотников М.Б., д.б.н., профессор, зав. лабораторией фармакологии кровообращения НИИ фармакологии СО РАМН, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 01.08.2013.