

УДК 577.118

Морфобиохимические параметры крыс при введении наночастиц диоксида титана**С.В. Нотова^{1,2}, Е.А. Сизова^{1,2}, Т.В. Казакова², О.В. Маршинская²**¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясного скотоводства»² ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет»

Аннотация. Ввиду широкого использования наночастиц диоксида титана (НЧ-TiO₂) в абсолютно разных сферах человеческой деятельности возникает вопрос о безопасности данного наноматериала. Особый интерес представляет изучение проблемы влияния наночастиц на организм, так как вещество в наноформе обладает совершенно новыми свойствами. Токсические свойства НЧ-TiO₂ в настоящее время изучены ещё недостаточно, поэтому данная тема является актуальной. В исследовании оценивались морфологические и биохимические параметры крови крыс линии Wistar после внутрибрюшинной инъекции наночастиц диоксида титана (НЧ-TiO₂) в дозах 13,3 и 133,3 мг/кг. Выбранные концентрации наночастиц не превышали максимальных переносимых доз (МПД) для данного металла. Размер используемых наночастиц составлял 90 нм. На первые, седьмые и четырнадцатые сутки проводили забор крови из хвостовой вены для дальнейшего анализа. Результаты показали повышение в сыворотке уровня активности аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, мочевины и креатинина на фоне общего лейкоцитоза. В ходе эксперимента не установлено дозозависимого характера эффектов, однако отмечены их манифестные проявления на первые сутки эксперимента с последующим нивелированием к седьмым суткам, что указывает на наличие адаптивных реакций в организме. Выявленные токсические эффекты НЧ-TiO₂ свидетельствуют о потенциальном риске для здоровья человека.

Ключевые слова: наночастицы диоксида титана (НЧ-TiO₂), аминотрансферазы, мочевина, креатинин, лейкоцитоз.

Введение.

Благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам (пигментным, сенсорным, адсорбционным, оптическим, электрическим и каталитическим), наночастицы диоксида титана (НЧ-TiO₂) приобрели широкий спектр использования. Примерно 60 % НЧ-TiO₂ применяется в строительстве (в составе лакокрасочной продукции, цемента, облицовочных плиток), 30 % – в производстве пластмасс, около 13 % – при изготовлении бумаги и 3 % – в электронике, катализаторах, косметике (солнцезащитный крем, зубная паста), а также в производстве керамики, типографской краски, сварочных флюсов, самоочищающихся стёкол, зеркал и других поверхностей [1, 2].

Большой интерес представляет изучение фотокаталитических (ФК) свойств данного материала, которые позволяют повысить эффективность технологических ФК процессов очистки воды и воздуха от токсических примесей. Все эти процессы направлены и на решение глобальных проблем энергосбережения. К тому же данное свойство используется и в медицине – фотодинамическая терапия, что нашло применение в онкологии [3].

Основными производителями TiO₂ на сегодняшний день являются: Du Pont (США), Crystal Global (Саудовская Аравия), Kronos (Германия), Tronox (США), на чьи доли приходится более 60 % общемирового производства TiO₂, которое в 2014 году составило около 6,5 млн тонн. Объёмы производства данного наноматериала в России сравнительно небольшие. Россия потребляет примерно 1,5 % общемирового производства TiO₂ [4].

Ввиду широкого использования НЧ-TiO₂ в абсолютно разных сферах человеческой деятельности возникает вопрос о безопасности данного наноматериала. Токсические свойства НЧ-TiO₂ в настоящее время изучены ещё недостаточно, хотя в разных странах мира ведутся обширные исследования по оценке их безопасности [5]. НЧ-TiO₂ могут попадать в организм через слизистые оболочки дыхательных путей и пищеварительного тракта, а также трансдермально при использовании косметических средств. По мнению профессора Г.М. Балана, основными органами-мишенями НЧ-TiO₂ являются ткани дыхательной, пищеварительной, иммунной, кожной систем, а критическими по последствиям их действия – головной мозг, спинной мозг, репродуктивные и выделительные органы [6].

Цель исследования.

Оценка влияния Hf-TiO_2 на морфо-биохимические параметры организма крыс.

Материалы и методы исследования.

Объект исследования. Исследования проводили в условиях экспериментально-биологической клиники Оренбургского государственного университета на 30 белых крысах-самцах линии Wistar массой 150-180 г, находящихся в стандартных условиях вивария и диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92), согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ 51000.4-96).

Экспериментальные исследования на животных проводили в соответствии с инструкциями, рекомендуемыми Российским Регламентом, 1987 г. и «The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D.C. 1996)». При выполнении исследований были приняты усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшения количества используемых образцов.

Схема эксперимента. Все экспериментальные животные были разделены на три группы ($n=10$). Животным I и II опытных групп однократно вводили Hf-TiO_2 в дозе 13,3 мг/кг и 133,3 мг/кг. Контрольной группе животных вводили изотонический раствор хлорида натрия 0,9 % (Р. № ЛСР-005263/07, С 0860514, годен до 05.2016 г.) в эквивалентном объёме. Выбранные концентрации наночастиц не превышали максимальных переносимых доз (МПД) для данного металла. На первые, седьмые и четырнадцатые сутки проводили забор крови из хвостовой вены для морфологического и биохимического исследований.

Оборудование и технические средства. В эксперименте использовали препараты наночастиц диоксида титана (Hf-TiO_2), произведённые ООО «Платина» (г. Москва) методом плазмохимического синтеза. Hf-TiO_2 в своём составе содержали 99,8 % TiO_2 и 0,2 % Cl_2 ; размером 90 нм, с удельной поверхностью 16,5 м²/г; Z-потенциалом -18,5±0,5 мВ. Материаловедческая аттестация (размер частиц, полидисперсность, объёмность, количественное содержание фракций, площадь поверхности) препаратов включала электронную сканирующую, просвечивающую и атомно-силовую микроскопию с использованием LEX T OLS4100, JSM 7401F, JEM-2000FX («JEOL», Япония). Размерное распределение частиц исследовалось на анализаторе наночастиц Brookhaven 90Plus/BIMAS Zeta PALS и Photocor Compact («Фотокор», Россия). Размер Hf определяли с использованием электронного микроскопа JSM-740 IF. Подготовку препарата наночастиц проводили в изотоническом растворе на ультразвуковом диспергаторе (f-35 кГц, N-300 Вт, A-10 мкА) путём диспергирования в течение 30 минут. Кровь для определения морфологических показателей отбирали в вакуумные пробирки с добавлением антикоагулянта, для биохимических показателей – в вакуумные пробирки с активатором свёртывания (тромбин). Морфологические показатели определяли с помощью автоматического геманализатора (модель URIT-2900 Vet Plus, URIT Medial Electronic Co., Китай). Биохимический анализ сыворотки крови проводился на автоматическом биохимическом анализаторе CS-T240 («Dirui Industrial Co., Ltd», Китай) с использованием коммерческих биохимических наборов для ветеринарии ДиаВетТест (Россия) и коммерческих биохимических наборов Randox (США).

Статистическая обработка. Обработка полученных данных проводилась при помощи методов вариационной статистики, с использованием статистического пакета STATISTICA 6.1.478 («Stat Soft Inc.», США). Хранение полученных результатов исследования и первичная обработка материала проводились в оригинальной базе данных «Excel» (Microsoft). Проверка соответствия полученных данных нормальному закону распределения определялась при помощи критерия согласия Колмогорова. Гипотеза о принадлежности данных нормальному распределению подтверждена во всех случаях с вероятностью 95 %, что даёт обоснование применять параметрические процедуры обработки статистических совокупностей.

Результаты исследования. При сравнении морфологических показателей крови выявлено, что наиболее значительные изменения наблюдались на первые сутки после внутрибрюшинного введения Hf в I опытной группе с вводимой дозой Hf-TiO_2 13,3 мг/кг (табл. 1). В частности, обнаружено увеличение количества лейкоцитов (в 1,2 раза; $p<0,05$), лимфоцитов (в 1,3 раза; $p<0,05$), моноцитов (в 1,4 раза; $p<0,05$), гранулоцитов (в 1,2 раза; $p<0,05$), эритроцитов, гемоглобина и тромбоцитов.

Во II опытной группе на седьмые сутки была отмечена тенденция к понижению всех изученных показателей, исключением является незначительное повышение уровня тромбоцитов.

Таблица 1. Морфологические показатели крови крыс при введении НЧ – TiO₂

Показатель	Контроль	I группа	II группа
		НЧ – TiO ₂ , мг/кг	
		13,3	133,3
1 сутки			
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,75±0,4	9,45±0,45*	6,2±0,9
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	3,72±0,09	4,9±0,06*	3,45±0,085
Моноциты, 10 ⁹ /л	1,55±0,025	2,3±0,01*	1,0±0,04
Ранулоциты, 10 ⁹ /л	2,47±0,025	2,95±0,095*	1,75±0,065
Эритроциты, 10 ¹² /л	7,0±0,065	7,5±0,53	5,99±0,077
Гемоглобин, г/л	141,75±3,0	155,0±7,0	117,5±4,5
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	215,75±3,0	237,0±5,0	221,5±16,5
7 сутки			
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	9,35±0,25	6,95±0,45	9,25±0,15
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	4,15±0,05	3,6±0,07	4,2±0,1
Моноциты, 10 ⁹ /л	1,75±0,015	1,3±0,02	1,8±0,03
Гранулоциты, 10 ⁹ /л	3,45±0,15	2,05±0,045	3,25±0,15
Эритроциты, 10 ¹² /л	8,45±0,15	7,17±0,295	8,47±0,96
Гемоглобин, г/л	173,5±8,5	149,0±3,0	170,0±9,0
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	182,0±8,0	134,5±7,5	206,5±5,5
14 сутки			
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6,15±0,05	7,35±0,15	8,25±0,05
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	3,3±0,07	3,3±0,3	4,25±0,15
Моноциты, 10 ⁹ /л	1,35±0,025	1,65±0,025	1,65±0,15
Гранулоциты, 10 ⁹ /л	1,5±0,01	2,4±0,06	2,35±0,015
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,7±0,265	7,03±0,57	5,65±0,02
Гемоглобин, г/л	110,0±9,0	151,0±15,0*	120,5±0,5
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	249,5±0,5	166,0±3,0*	243,5±8,5

Примечание: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$ при сравнении экспериментальных образцов с интактными

К 14 суткам I опытная группа характеризовалась повышением гемоглобина (в 1,3 раза; $p < 0,05$) и снижением тромбоцитов (в 1,5 раза; $p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Во II опытной группе статистические значимые различия с контролем не выявлены.

Анализ биохимических параметров крови показал, что однократное внутрибрюшинное введение НЧ-TiO₂ приводит к увеличению всех изученных показателей на первые сутки (табл. 2).

В процессе анализа результатов было отмечено, что наибольшим изменениям подвергаются показатели АЛаТ, АСаТ, креатинина и мочевины.

Так, наибольшая активность АЛаТ отмечена у I опытной группы на первые (в 3,5 раза; $p < 0,05$) и седьмые сутки (в 2,5 раза), на 14 сутки активность фермента несколько падает, однако остаётся выше, чем в контроле практически в 2 раза.

АСаТ наиболее активен также в I группе и превышает данные в контроле на первые (в 2 раза), седьмые (в 4,8 раз) и на 14 сутки (в 2 раза). Парадоксальным, на наш взгляд, является отсутствие изменение уровня АСаТ и АЛаТ на первые сутки при максимальной дозе НЧ. Однако к седьмым и 14 суткам у II опытной группы наблюдалась отчётливая тенденция к повышению активности данных ферментов.

Таблица 2. Биохимические показатели крови крыс при введении НЧ-TiO₂

Показатель	Контроль	I группа	II группа
		TiO ₂ -НЧ, мг/кг	
		13,3	133,3
1 сутки			
АлаТ, Е/л	39,27±3,53	140,05±11,45*	36,3±2,3
АСаТ, Е/л	269,22±23,58	454,5±29,3	27,9±2,0
ЛДГ, Е/л	1494,68±132,3	2249,5±192,5	3072,0±122,0
СОД, %	1046,16±79,49	1241,45±79,06	1233,76±87,61
Креатинин, мкмоль/л	20,06±1,15	43,6±2,9	52,5±3,7
Билирубин общ., мкмоль/л	4,77±0,32	10,56±1,585	47,39±3,23
Мочевина, ммоль/л	2,36±0,14	6,25±0,25	3,2±0,08
Креатинкиназа, Е/л	3119,13±222,07	5892,15±467,55	3979,75±160,25
Общий белок, г/л	33,41±3,224	69,11±2,26	81,23±2,06
Глюкоза, ммоль/л	3,27±0,959	5,63±0,285	5,31±0,350
7 сутки			
АлаТ, Е/л	50,7±4,9	129,9±7,6	114,25±1,85
АСаТ, Е/л	102,85±7,65	498,8±13	225,45±32,75
ЛДГ, Е/л	2937,5±104,5	2461,5±53,5	3024,0±133,0
СОД, %	1066,55±63,67	1130,58±13,31	952,16±10,43
Креатинин, мкмоль/л	30,25±1,85	46,45±1,55	29±1,6
Билирубин общ., мкмоль/л	45,99±3,49	9,76±0,06	11,22±1,89
Мочевина, ммоль/л	2,2±0,06	8,8±0,1**	3,3±0,2
Креатинкиназа, Е/л	1566,15±106,05	4759,35±130,15	2323,9±22,8
Общий белок, г/л	32,34±0,180	32,41±0,115	30,62±1,435
Глюкоза, ммоль/л	4,47±0,145	4,69±0,055	3,64±0,545
14 сутки			
АлаТ, Е/л	43,85±3,25	94,7±1,7	91,15±6,15
АСаТ, Е/л	95,8±5,7	153,75±12,85	344,5±11,8
ЛДГ, Е/л	1571,5±65,5	1385,5±38,5	1720,5±67,5
СОД, %	733,4±34,9	759,26±28,05	615,86±19,025
Креатинин, мкмоль/л	7,3±0,2	30,25±1,95*	40,7±1,9**
Билирубин общ., мкмоль/л	13,72±0	9,21±0,88	3,11±0,49**
Мочевина, ммоль/л	4±0,3	5,2±0,4	5,3±0,09
Креатинкиназа, Е/л	506,35±26,85	2332,4±126,6	4770,65±113,75*
Общий белок, г/л	46,49±2,170	75,28±3,180	69,05±3,625
Глюкоза, ммоль/л	3,80±0,083	3,81±0,081	4,41±0,025

Примечание: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$ при сравнении экспериментальных образцов с интактными

Уровень ЛДГ отличается высокими значениями на протяжении всего эксперимента во II опытной группе по сравнению с контрольной и I группами.

На первые (в 2,6 раз) и особенно на седьмые сутки (в 4 раза) произошло резкое возрастание уровня мочевины у I группы, затем к 14 суткам данный показатель стал выравниваться к норме. У II группы, несмотря на более высокую дозу НЧ-TiO₂, показатели практически остались без изменений.

Обсуждение полученных результатов.

Как известно, главной сферой действия лейкоцитов является специфическая и неспецифическая защита организма от внешних и внутренних патогенных агентов, поэтому абсолютно закономерно, что на первые сутки после однократного введения НЧ-TiO₂ отмечался лейкоцитоз, служащий показателем воспалительного процесса. К седьмым суткам показатели лейкоцитов и его фракций восстановились, что, вероятно, свидетельствует о нормализации гомеостаза за счёт адаптивных реакций в организме. На момент завершения эксперимента показатели «белой крови» практически не отличались от контроля, что, вероятно, связано с выведением НЧ-TiO₂ из организма.

В ходе всего исследования наблюдалась тенденция увеличения количества гемоглобина при достаточно стабильном уровне эритроцитов. Наши данные согласуются с результатами исследования изучения биологических эффектов при внутрижелудочном введении НЧ-TiO₂ [7, 8]. Отмечалось снижение тромбоцитов во всех опытных группах. Интересно заметить тот факт, что у II опытной группы на фоне максимальной дозировки отмечалось повышение уровня тромбоцитов при общей динамике их понижения у I опытной группы.

АЛaT и АСаT являются метаболическими ферментами печени, повышение показателя их активности в сыворотке крови свидетельствует о повреждении печёночных клеток и их мембран [9]. Полученные результаты говорят о повреждении гепатоцитов НЧ-TiO₂. Мочевина образуется в организме при распаде протеинов, является конечным продуктом белкового обмена и выводится вместе с мочой. По её уровню содержания судят о работе почек [10]. Повышение мочевины в крови может быть признаком заболевания почек, возможен некроз почечных канальцев.

Креатинин выводится из организма почками с мочой, поэтому его количество в крови является важным показателем работы этого органа [11]. Его увеличение у I и II опытных групп может свидетельствовать об умеренной почечной недостаточности. В результате могут развиваться серьёзные нарушения водно-солевого, кислотно-щелочного и осмотического гомеостаза, которые приводят к вторичному повреждению всех систем организма.

Изучение параметров белкового обмена показало, что достоверных различий не было выявлено. Однако на первые сутки было отмечено резкое увеличение данного показателя у I (в 2 раза) и II (в 2,5 раза) опытных групп. К седьмым и 14 суткам уровень белка в организме приблизился к показателям контрольной группы.

В процессе исследования мы наблюдали за изменением показателя глюкозы в крови. На первые, седьмые и 14 сутки у I и II опытных групп мы увидели незначительное увеличение уровня глюкозы в пределах нормы. Это показывает, что при введении НЧ не был нарушен углеводный обмен [12].

Выводы.

Проведённые исследования выявляют негативное воздействие НЧ-TiO₂ на организм, которое может быть причиной развития патологических состояний, в частности печени и почек. В ходе эксперимента не установлено дозозависимого характера эффектов, однако отмечены их манифестные проявления на первые сутки эксперимента с последующим нивелированием к седьмым суткам, что указывает на наличие адаптивных реакций в организме. Выявленные токсические эффекты НЧ-TiO₂ свидетельствуют о потенциальном риске для здоровья человека, а также для биоты окружающей среды.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда проект №14-36-00023.

Литература

1. Hamilton R.F., Nianqiang Wu, Porter D. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity // Particle and Fibre Toxicology, 2009. 11 p.
2. Robichaud K.O., Uyar A.E., Darby M.R. Estimates of Upper Bounds and Trends in NanoTiO₂ Production As a Basis for Exposure Assessment // Environ. Sci. Technol, 2009. 43 p.
3. Zhang AiiPing, Sun YannPing. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Lss1744t human // World J Gastroenterol, 2004.10 p.

4. Латышев Ю.В. История и перспективы производства диоксида титана в России. М.: «Ариком», 2007. 25 с.
5. Besley J., Kramer V., Priest S. Expert opinion on nanotechnology: risks, benefits, and regulation // Journal of Nanoparticle Research. 2008. 10(4). P. 549-558.
6. Проданчук Н.Г., Балан Г.М. Наночастицы диоксида титана и их потенциальный риск для здоровья и окружающей среды. Киев: Институт гигиены и токсикологии, 2011. 11 с.
7. Anemia and genotoxicity induced by sub-chronic intragastric treatment of rats with titanium dioxide nanoparticles / I. Grissa, J. Elghoul, L. Ezzi, S. Chakroun, E. Kerkeni, M. Hassine, L. El Mir, M. Mehdi, H. Ben Cheikh, Z. Naouas // Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2015. Dec;794:25-31. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.09.005. Epub 2015 Sep 25.
8. Effect of titanium dioxide nanoparticles on hemogram in rats with gastric ulcer / Y. Wang, T. Ba, Z.-J. Chen, J. Pu, X.-X. Cui, H.-Y. Nie, H.-F. Wang, G. Jia // Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 2012. Aug;46(8):740-4.
9. Камышников В.С. Клинико-лабораторная диагностика заболеваний печени. М.: МЕДпресс-информ, 2013. 21 с.
10. Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. Биохимические анализы в клинике. М.: Триада-Х, 2009. 210 с.
11. Engineered nanomaterials: a review of the toxicology and health hazards // Safe work Australia, 2009, November, 143 p. DOI: <http://www.ag.gov.au/ccs>.
12. Семиколонова Н.А. Медицинская биохимия: лабораторный практикум. Омск: изд-во ОмГУ, 2005. 76 с.

Нотова Светлана Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий учебным центром ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясного скотоводства», 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 8(3532)43-46-80; профессор кафедры биохимии и микробиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г. Оренбург, просп. Победы, 13, сот.: 89033670370, e-mail: snotova@mail.ru

Сизова Елена Анатольевна, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории «Агроэкология техногенных наноматериалов» ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясного скотоводства», 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 8(3532)43-46-80; доцент кафедры биологии и почвоведения ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г. Оренбург, просп. Победы, 13, сот.: 89123449907, e-mail: sizova.l78@yandex.ru

Казакова Татьяна Витальевна, студент 4 курса химико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г. Оренбург, просп. Победы, 13, сот.: 89878884528, e-mail: vaisvais13@mail.ru

Маршинская Ольга Владимировна, студент 4 курса химико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», 460018, г. Оренбург, просп. Победы, 13, сот.: 89878993068, e-mail: m.olja2013@yandex.ru

UDC 577.118

Notova Svetlana Viktorovna^{1,2}, Sizova Elena Anatolevna^{1,2}, Kazakova Tatiana Vitalievna², Marshinskaya Olga Vladimirovna²

¹ FSBSI «All-Russian Research Institute of Beef Cattle Breeding», e-mail: snotova@mail.ru

² FSBEI HE «Orenburg State University», e-mail: vaisvais13@mail.ru

Morphological and biochemical parameters of rats after administration of titanium dioxide nanoparticles

Summary. A question about the safety of nanomaterials arises due to the wide use of TiO₂ nanoparticles of titanium dioxide in completely different spheres of human activity. The study of nanoparticles influence on the body is of particular interest, as the substance in nanoform has brand new properties. At present, the toxic properties of TiO₂ nanoparticles are insufficiently explored, so this topic is relevant.

Morphological and biochemical blood parameters of Wistar rats were assessed in the study after intraperitoneal injection of titanium dioxide (TiO₂ nanoparticles) in doses of 13,3 and 133,3 mg/kg. The selected concentrations of nanoparticles does not exceed the maximum tolerated dose (MTD) for a given metal. The size

of nanoparticles is 90 nm. On day 1, 7 and 14 blood sampling was carried out from the tail vein for further analysis. The results demonstrated an increase in serum the levels of aspartate aminotransferase, alanine, urea and creatinine activity in the background of a general leukocytosis. During the experiment, no dose-dependent character of effects was shown, but their clinical displays were registered on the first day of experiment, it was followed by a leveling on the seventh day, indicating the presence of adaptive responses in the body. Known toxic effects of TiO₂ nanoparticles show potential risk to human health.

Key words: nanoparticles of titanium dioxide (TiO₂ NPs), aminotransferase, urea, creatinine, leukocytosis.