

Изменения показателей крови лабораторных животных при введении наночастиц серебра

И.Р. Шамсутдинова, аспирантка, М.А. Дерхо, д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО Южно-Уральский ГАУ

Наночастицы имеют маленький размер и большую величину межфазной поверхности, что обуславливает наличие у них свойств, отличных от их аналогов в макродисперсной форме [1]. Поэтому необходимым аспектом использования наночастиц в биологии, биотехнологии и ветеринарной медицине является оценка их безопасности для здоровья организма животных.

В последнее время значительно повысился интерес к наночастицам серебра, обладающим ярко выраженной антимикробной активностью даже по отношению к антибиотикорезистентным патогенным микроорганизмам [2]. При этом влияние наносеребра на физиологический статус организма животных до сих пор остаётся малоизученным.

Механизм действия наночастиц на живые организмы, лежащий в основе их биологических и патологических эффектов, можно раскрыть, изучая их токсичность. При оценке риска для здоровья животных необходимо учитывать не только биокинетические параметры наночастиц, но и их влияние на активность и направленность метаболических процессов [3, 11], так как объекты нанометровых диапазонов приближаются к размеру, которые клетки организма воспринимают как молекулярные сигналы.

Одними из первичных мишеней токсического действия ксенобиотиков в организме животных являются белки [4, 5], так как они выполняют свои биологические функции, участвуя в метаболизме клеток, транспорте и синтезе энергии, переносе низкомолекулярных веществ, иммунной реактивности организма и т.д. [6, 7]. В настоящее время имеются немногочисленные исследования о влиянии наночастиц на обмен белков в организме животных. При этом о его состоянии судят в основном по динамике некоторых биохимических параметров в крови [8]. Практически отсутствуют данные об изменениях каталитических белков в клетках внутренних органов организма.

В связи с этим **целью** нашей работы явилось изучение влияния водной дисперсии наночастиц серебра на изменчивость аминотрансфераз в плазме крови, клетках печени и почек лабораторных крыс.

Материал и методы исследования. Экспериментальная часть работы выполнена на базе вивария и кафедры органической, биологической и физколлоидной химии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный аграрный университет» в 2015 г. Объектом исследования являлись самцы крыс линии Вистар с массой тела 240–270 г, которых

содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении. Для проведения эксперимента было сформировано четыре группы ($n=14$): I – контрольная, животные которой содержались на стандартном пищевом и водном рационе, II, III и IV – опытные. Животным опытных групп в течение 30 сут. добавляли в питьевую воду водную дисперсию наночастиц серебра в суточной дозе соответственно 4,25; 6,61 и 12,81 мг на 1 кг живой массы.

Материал исследований (кровь, печень, почки) получали после декапитации крыс, которую проводили под наркозом эфира с хлороформом с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Печень и почки перфузировали охлаждённым физраствором, гомогенизировали в среде выделения, содержащей 0,005н Tris, 0,1н KCl в соотношении 1:100 для печени и 1:50 для почек. Полученный гомогенат центрифугировали. В супернатанте и плазме крови определяли активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ) при помощи стандартных наборов реактивов «Клини-тест». В печени и почках активность ферментов рассчитывали на 1 г ткани.

Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики на ПК с помощью табличного процессора «Microsoft Excel-2003» и пакета прикладной программы «Биометрия».

Результаты исследования. Под влиянием водной дисперсии наночастиц серебра, введённой животным перорально, у особей I и II опытных гр. происходило снижение активности АсАТ как по сравнению с контролем, так и величиной до опыта на 10,2–11,8% ($P<0,001$) на фоне незначительных колебаний АлАТ, что обуславливало снижение значения коэффициента де Ритиса (табл. 1). Исходя из того что фермент АсАТ является маркером активности митохондрий в клетках организма [4, 5], можно утверждать: наночастицы серебра в суточной дозе 4,25 и 6,61 мг/кг снижали скорость использования свободных аминокислот в синтезе энергии посредством цикла Кребса. В то же время у крыс III гр., наоборот, уровень АсАТ и АлАТ достоверно увеличивался на 26,0–29,5% ($P<0,001$) на фоне сохранения их соотношения, оцениваемого по величине коэффициента де Ритиса (табл. 1). Полученные данные, с одной стороны, свидетельствовали об изменении степени вовлечения аминокислотных остатков в биохимические процессы организма животных за счёт реакций переаминирования, а с другой – об изменении проницаемости клеточных мембран внутренних органов.

Следовательно, активность ферментов в крови зависела от количества наносеребра, поступившего в организм животных. Аналогичные данные были получены при изучении влияния наночастиц серебра на физиологический статус животных [8, 9].

Для выяснения различий в сдвигах активности аминотрансфераз в крови крыс опытных групп мы изучили динамику ферментов в супернатантах почек и печени, являющихся основными органами детоксикации в животном организме.

Установлено, что относительная масса почек в организме крыс опытных групп достоверно снижалась на 2,7–8,3% по сравнению с контролем и величиной до опыта (табл. 1). Уменьшение массы органа сопровождалось дозозависимым снижением активности АсАТ в супернатанте почек крыс I гр. на 12,6% ($P < 0,001$), II – на 25,2% ($P < 0,001$) и III – на 42,4% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем. Уровень АлАТ в клетках почек животных I и II гр. тоже падал на 7,7–9,5% ($P < 0,001$), а III, наоборот – увеличивался на 19,0% ($P < 0,001$) по сравнению с фоном. При этом величина соотношения аминотрансфераз в виде коэффициента де Ритиса уменьшалась и зависела от количества

наночастиц серебра, вводимых перорально в организм животных.

В целом, оценивая характер изменений каталитической активности АсАТ и АлАТ в супернатанте почек, характеризующих активность процессов переамирирования аминокислот в её клетках, можно констатировать, что поступление водной дисперсии наночастиц серебра влияло на степень использования белковых субстратов органом в синтезе энергии. Данный вывод согласуется с данной точкой зрения Л.А. Кульского [10], отмечавшего, что серебро влияет на интенсивность энергетического обмена путём воздействия на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях. Возможно, наносеребро повышало степень использования аминокислот в анаболизме других белков (защитных) [10], что ограничивало активность процессов глюконеогенеза.

Хотелось бы отметить, что наночастицы серебра в суточной дозе 12,68 мг/кг оказывали мембранотоксичное действие на плазматические мембраны клеток почек, о чём свидетельствовало увеличение активности АлАТ в супернатанте органа.

Относительная масса печени в организме крыс I и II гр. достоверно не изменялась в ходе экс-

1. Изменения аминотрансфераз в крови и супернатанте почек (n=7; $X \pm Sx$)

Показатель	Время исследований	Опытные группы			
		контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Плазма крови					
АсАТ, мкмоль/ч · мл	до опыта ч/з 30 сут.	2,90±0,02 2,88±0,017	2,84±0,03 2,55±0,039***	2,83±0,02 2,54±0,027***	2,81±0,03 3,64±0,085***
АлАТ, мкмоль/ч · мл	до опыта ч/з 30 сут.	4,12±0,03 4,00±0,088	4,03±0,04 3,77±0,069	4,04±0,04 3,86±0,09	3,99±0,05 5,04±0,084***
Коеф. де Ритиса, усл. ед.	до опыта ч/з 30 сут.	0,70±0,008 0,74±0,015	0,70±0,009 0,68±0,012*	0,70±0,006 0,67±0,014*	0,71±0,011 0,72±0,025
В супернатанте почек, на 1 г ткани					
Относительная масса почек, %	до опыта ч/з 30 сут.	0,36±0,010 0,36±0,009	0,35±0,010 0,33±0,049	0,36±0,005 0,35±0,004	0,36±0,012 0,33±0,018
АсАТ, мкмоль/ч · мл	до опыта ч/з 30 сут.	35,51±0,20 36,94±0,17	36,61±0,38 32,28±0,42***	36,40±0,34 27,62±0,28***	35,72±0,61 21,27±0,62***
АлАТ, мкмоль/ч · мл	до опыта ч/з 30 сут.	86,46±0,40 83,61±0,39	88,87±0,99 75,61±0,15***	87,49±0,61 77,20±0,45***	86,43±0,49 99,53±1,93***
Коеф. де Ритиса, усл. ед.	до опыта ч/з 30 сут.	0,41±0,0019 0,44±0,004	0,42±0,008 0,43±0,006	0,42±0,004 0,36±0,005***	0,41±0,008 0,21±0,007***

Примечание: * – $P < 0,05$; *** – $P < 0,001$ по отношению к величине «контроль»

2. Изменения аминотрансфераз в супернатанте печени, (n=7; $X \pm Sx$)

Показатель	Время исследований	Группа			
		контрольная	I опытная	II опытная	III опытная
Относительная масса печени, %	до опыта ч/з 30 сут.	3,09±0,071 3,05±0,062	3,07±0,079 3,14±0,077	3,09±0,10 3,03±0,11	3,06±0,09 2,64±0,15*
АсАТ, мкмоль/ч · мл	до опыта ч/з 30 сут.	14,22±0,27 14,65±0,24	14,67±0,14 10,25±0,40***	13,96±0,23 10,36±0,17***	14,12±0,30 6,74±0,11***
АлАТ, мкмоль/ч · мл	до опыта ч/з 30 сут.	36,23±0,69 36,40±0,64	35,69±1,04 33,85±0,69	34,93±0,61 32,76±0,56*	36,16±0,57 25,91±0,32***
Коеф. де Ритиса, усл. ед.	до опыта ч/з 30 сут.	0,39±0,003 0,40±0,005	0,41±0,015 0,30±0,011***	0,40±0,008 0,33±0,01***	0,39±0,011 0,26±0,007***

Примечание: * – $P < 0,05$; *** – $P < 0,001$ по отношению к величине «контроль»

перимента, а III снижалась на 13,4% ($P < 0,05$) по сравнению с контролем и величиной до опыта. В супернатанте печени, как и супернатанте почек, были отмечены дозозависимые сдвиги в каталитической активности АсАТ и АлАТ, которые сопровождалась снижением величины коэффициента де Ритиса (табл. 2). При этом уровень ферментативных сдвигов был более выражен в супернатанте печени, чем почек. Возможно, это являлось следствием того, что печень является основным органом, участвующим в выведении наночастиц серебра из организма животных [1].

Таким образом, результаты наших исследований позволили сделать следующие **выводы**. Во-первых, пероральное поступление водной дисперсии наночастиц серебра в организм крыс более существенно влияет на уровень активности АсАТ в плазме крови, супернатанте печени и почек крыс, чем АлАТ, что подтверждает его участие в функционировании митохондрий и обмене энергии. Во-вторых, ферментативные сдвиги более значительно выражены в супернатанте печени, чем почек, что связано с большим участием органа в элиминации металла. В-третьих, изменения активности аминотрансфераз в крови, супернатанте печени и почек дозозависимы. В-четвёртых, поступление водной дисперсии наночастиц серебра в суточной дозе 12,81 мг/кг оказывало мембранотоксичное действие на клетки почек.

Литература

1. Распопов Р.В. Биодоступность и биокинетические характеристики некоторых приоритетных наноматериалов в эксперименте: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.: НИИ питания РАМП, 2011. 24 с.
2. Егорова Е.М., Ревина А.А., Румянцев Б.В. Получение и антимикробные свойства водных дисперсий наночастиц серебра // Физикохимия ультрадисперсных (нано-) систем: сб. научн. трудов VI Всерос. конф. М., 2003. С. 149–152.
3. К вопросу о токсичности наночастиц серебра при пероральном введении коллоидного раствора / Е.Н. Петрицкая, Л.Ф. Абаева, Д.А. Рогаткин [и др.] // Альманах клинической медицины. 2011. № 25. С. 9–12.
4. Адаптационные изменения активности ферментов в организме мышей при оксидативном стрессе / Е.А. Ткаченко, М.А. Дерхо, О.А. Романкевич [и др.] // Вестник ветеринарии. 2013. Вып. 65. С. 65–69.
5. Характеристика печёночной ферментемии в условиях кадмиевой интоксикации / Е.А. Ткаченко, М.А. Дерхо, О.С. Романкевич [и др.] // Вестник НГАУ. 2014. Т. 1. № 30. С. 96–99.
6. Елисеевкова М.В., Дерхо М.А. Особенности метаболического гомеостаза грызунов, обитающих в условиях природной биохимической провинции // Аграрный вестник Урала. 2010. № 6. С. 55–58.
7. Серета Т.И., Дерхо М.А., Разумовская Л.М. Характеристика белковых фракций сыворотки крови кур кросса Ломан-белый и их связь с яичной продуктивностью // Ветеринарный врач. 2009. № 6. С. 67–69.
8. Прискока А.О. Влияние наночастиц серебра на биохимические показатели сыворотки крови мышей // Медицина и образование в Сибири. 2014. № 5. [Электронный ресурс]. URL: www.ngmu.ru (дата обращения 29.06.2015).
9. Тарабанова Е.В. Физиологический статус сельскохозяйственной птицы в раннем онтогенезе при выращивании с использованием серебряного наноконпозита: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Новосибирск: НГАУ, 2013. 23 с.
10. Кульский Л.А. Серебряная вода. Киев: Наукова Думка, 1987. 152 с.
11. Carbon nanotubes as nanomedicines: from toxicology to pharmacology / L. Lacerda, A. Bianco, M. Plato [et. al.] // Ach. Drug Deliv Rev. 2006. № 58. P. 1460–1470.