

Изменения в морфофункциональном статусе, росте и развитии печени крыс при воздействии наночастиц Мо и МоО₃*

Е.В. Шейда, к.б.н., ФГБОУ ВО Оренбургский ГУ; **Е.А. Русакова**, к.б.н., **Е.А. Сизова**, д.б.н., ФГБОУ ВО Оренбургский ГУ, ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН, **О.Ю. Сипайлова**, к.б.н., ФГБОУ ВО Оренбургский ГМУ; **Д.Б. Косян**, к.б.н., ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН

Прогресс в сфере нанотехнологий стимулирует потребительский рынок и увеличение потребления материалов и продуктов, связанных с ним. Обозначенная тенденция подтверждается областью применения наноматериалов в различных сегментах, включая продукты питания, электронику, фармацевтику, биотехнологию, косметику, здравоохранение и сельское хозяйство [1, 2]. Именно поэтому многие наночастицы (НЧ) всё больше и больше синтезируются с исключением в них возможных токсических эффектов [3].

Наночастицы имеют чрезвычайно малые размеры и демонстрируют механические, оптические, магнитные и химические свойства, отличные от других частиц. Использование этих свойств НЧ являются основой нанотехнологий [4]. Тем не менее свойства, делающие наноматериалы такими привлекательными, как, например, малый размер, разнообразная форма и высокая площадь поверхности, также могут быть причиной загрязнения окружающей среды и оказывать вредное воздействие на жизнь и здоровье людей и других живых организмов [5–8]. Так, НЧ молибдена и его триоксида (Мо и МоО₃), обладая уникальными свойствами и используемые в качестве антимикробных и противогрибковых препаратов [9, 10], обладают и достаточно высокой токсичностью на живые организмы. Поэтому целью нашего исследования явилось изучение воздействия НЧ Мо и МоО₃ на рост и развитие печени крыс, выявление гепатотропного эффекта с оценкой выраженности и обратимости морфологических изменений в печени.

Материал и методы исследования. Биомедицинские исследования проводили на 100 белых крысах-самцах линии *Wistar* массой 110–180 г. До начала эксперимента животные содержались в условиях экспериментально-биологической клиники ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет» на стандартной диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92) согласно правилам лабораторной практики при

проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96). Эксперименты проводили в соответствии с требованиями гуманного обращения с животными [4].

В качестве источников микроэлементов использовали НЧ Мо и МоО₃ (табл.).

Оба образца были получены методом плазмохимического синтеза. Размеры частиц оценивали на основе измерений удельной поверхности, для чего использовали прибор Sorbi®-М (Meta®, Россия). Микроструктуру порошков анализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа PhilipsCM-30 (Philips, Япония). Для определения фазового состава использовали дифрактометр RigakuD/MAX-2200VL/PC (Rigaku, Япония), излучение CuK α .

НЧ Мо в своём составе содержали не менее 99,7% Мо и 0,30% О₂ размером 50,0±0,56 Нм, с удельной поверхностью 14,0 м²/г. НЧ МоО₃ в своём составе содержали 99,8% МоО₃ и 0,20% О₂ размером 92,0±0,54 Нм, с удельной поверхностью 12,0 м²/г.

При получении лиозолов водные взвеси УДЧ Мо и МоО₃ обрабатывали ультразвуком на диспергаторе УЗДН-2Т («НПП Академприбор», Россия) при 35 кГц, 300/450 Вт, 10 мкА в течение 30 мин. Лиозолы НЧ вводили однократно внутривентально.

Все экспериментальные животные были разделены на пять групп (n=6). Животные содержались в одинаковых условиях, с одинаковым рационом. Контрольную и опытные группы сформировывали из животных одного возраста. Разброс в группах по исходной массе не превышал 10%. Животным I и II опытных гр. однократно внутривентально вводили НЧ Мо в дозе 1,0 мг/кг и 25,0 мг/кг; животным III и IV опытных групп – НЧ МоО₃ в дозе 1,2 мг/кг и 29,0 мг/кг соответственно. Животным контрольной гр. вводили изотонический раствор хлорида натрия 0,9% в эквивалентном объёме. Выбранные концентрации ультрадисперсных частиц не превышали максимальных переносимых доз (МПД) для данного металла. Животных взвешивали каждые три дня в течение всего периода исследования. По окончании эксперимента (14-е сут.) крыс декапировали под нембуталовым наркозом. После этого проводили анатомическую разделку и взвешивание внутренних органов животных.

Характеристика используемых НЧ Мо и МоО₃

№ образца	НЧ	Удельная поверхность, м ² /г	Размер, Нм	Фазовый состав, %	
				Мо	О ₂
1	Мо	14,0	50,0±0,56	99,7	0,30
2	МоО ₃	12,0	92,0±0,54	99,8	0,20

* Работа выполнена при поддержке областного гранта по соглашению №36 от 31.07.2018 г.

Контроль за ростом особей осуществлялся ежедневно путём индивидуального взвешивания, утром, до кормления (± 2 г). На основании результатов взвешивания были рассчитаны абсолютный и среднесуточный приросты, изучена динамика роста подопытных животных, а также отношение массы печени к массе тела. Биоматериал для исследования получали после декапитации крыс под нембуталовым наркозом (5 особей в каждом варианте опыта и в контроле на 1-е, 7-е и 14-е сут. Затем животных препарировали, проводили анатомическую разделку (кости, кожа, скелетная мускулатура, внутренние органы) с последующим взвешиванием, измельчением и формированием средней пробы (10 г) по каждой особи.

Для морфологического исследования на светоптическом уровне кусочки печени фиксировали в 10-процентном нейтральном формалине и заливали в парафиновую смесь *HistoMix* (ООО «БиоВитрум», Россия). Морфологический состав образцов ткани печени оценивали на гистологических срезах толщиной 5–6 мкм, изготовленных на полуавтоматическом микротоме (МЗП 01 – «Техном», Россия) и окрашенных гематоксилином и эозином.

Основные данные, полученные в исследовании, были обработаны с использованием программ «Excel» и «Statistica 6,0».

Результаты исследования. Было изучено влияние наночастиц Мо и MoO_3 на массу внутренних органов крыс.

Концентрация 1,0 мг/кг НЧ Мо способствовала максимальному изменению массы лёгких и почек животных в сторону их увеличения на 14,9 и 7,22%

относительно контрольного образца. Кроме того, среди общей тенденции увеличения массы органов отмечалось снижение массы селезёнки, печени и сердца у крыс опытных групп на 14,6; 14,5 и 10,5% при сравнении с контролем (рис. 1А).

Воздействие 25,0 мг/кг НЧ Мо привело к наибольшему увеличению массы лёгких у особей II опытной гр. – на 48,3% больше, чем в контроле. При воздействии данной концентрации НЧ Мо проявилось снижение массы селезёнки, сердца, печени и почек на 19,1; 17,9; 16,3 и 8,33% у крыс I, II, III и IV опытных групп по сравнению с аналогами контрольной гр.

Максимальные скачки в изменении массы (снижение массы) при концентрации 1,2 мг/кг НЧ MoO_3 отмечались среди таких органов животных III опытной гр., как сердце (на 41,8%), печень (33,7%), почки (29,3%) и селезёнка (22,8%) при сравнении с показателями у крыс контрольной гр. Увеличение массы лёгких при этом было незначительным – на 4,33% относительно контрольных значений (рис. 1В).

Примечательно, что концентрация НЧ MoO_3 29,0 мг/кг способствовала равномерному увеличению массы таких органов, как почки и селезёнка на 5,93 и 2,03% у крыс IV опытной гр. при сравнении с аналогами контрольной гр. Вместе с тем было отмечено максимальное увеличение массы печени (на 21,3%) относительно контроля. Концентрация НЧ MoO_3 в количестве 29,0 мг/кг приводила к изменениям в сторону уменьшения массы сердца на 3,51% у крыс IV опытной гр. в отличие от показателей у животных контрольной гр. (рис. 1Г).

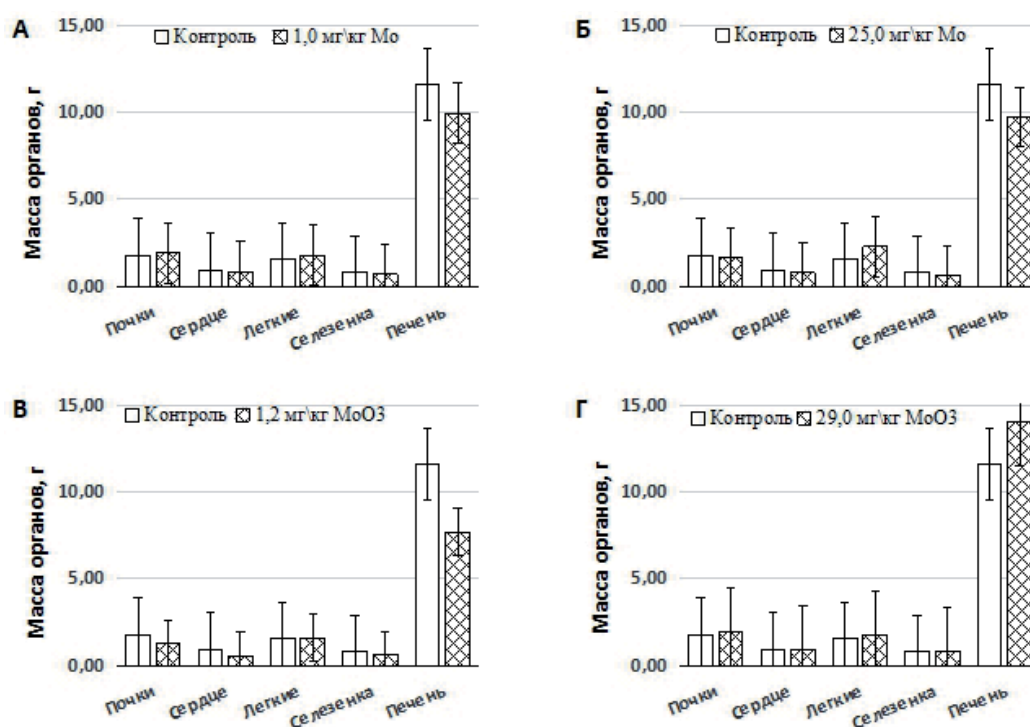


Рис. 1 – Изменение массы внутренних органов крыс при воздействии различных концентраций НЧМо и MoO_3 : А – 1,0 мг/кг НЧМо; В – 25,0 мг/кг НЧМо; С – 1,2 мг/кг НЧ MoO_3 ; Д – 29,0 мг/кг НЧ MoO_3

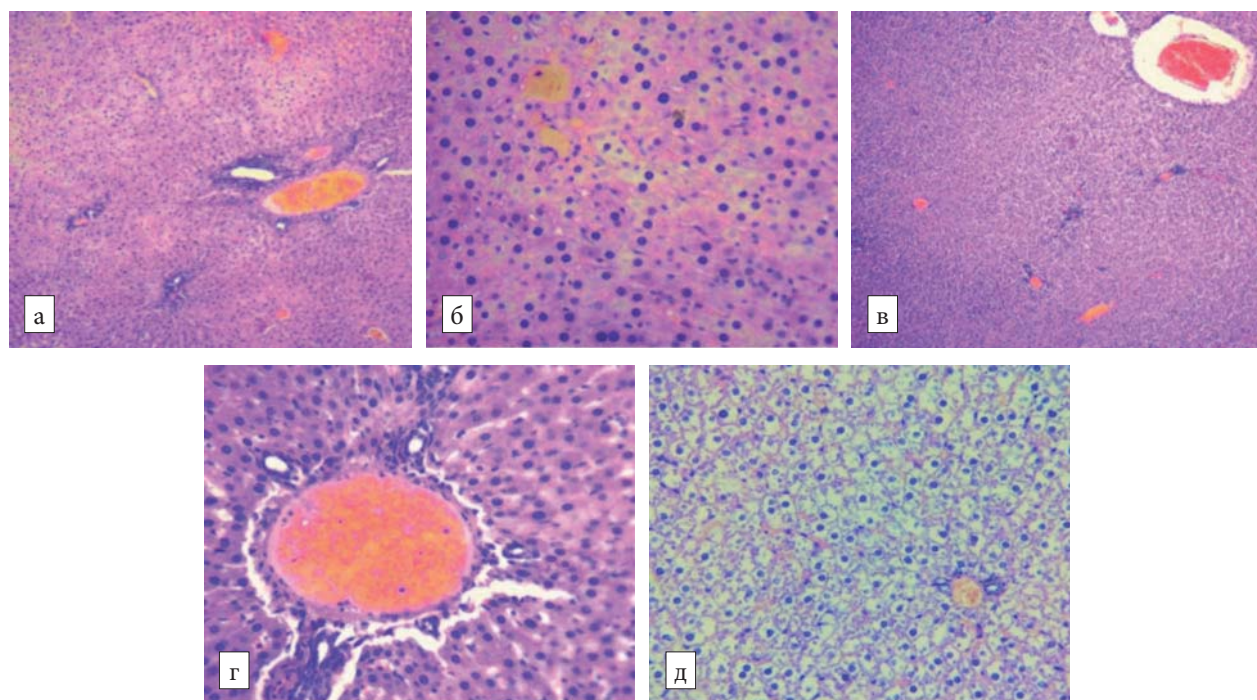


Рис. 2 – Печень крыс при введении УДЧМо и MoO_3 в различных концентрациях:

а – на 7-е сутки после введения 1,0 мг/кг УДЧ Мо. Увеличение: 40×10; б – на 14-е сутки после введения 1,0 мг/кг УДЧ Мо. Увеличение: 10×10; в – на 7-е сутки после введения 25,0 мг/кг УДЧ Мо. Увеличение: 10×10; г – на 7-е сутки после введения 1,2 мг/кг УДЧ MoO_3 . Увеличение: 40×10; д – на 14-е сутки после введения 29,0 мг/кг УДЧ MoO_3 . Увеличение: 40×10. Окраска: гематоксилином и эозином

В ходе исследования было изучено влияние НЧ Мо и MoO_3 на морфофункциональный статус печени крыс. Внутривентральное введение 1,0 мг/кг НЧ Мо (I опытная гр.) на 1-е сутки наблюдения не оказало влияния на общую структурную организацию печени. Тем не менее выявлено мутное набухание цитоплазмы гепатоцитов, стёртость их границ при сохранении балочного строения дольки, а также преобладание гепатоцитов с увеличенными, гиперхромными ядрами и крупными ядрышками. 7-е сутки наблюдения показали наличие процессов нарушения кровообращения в виде полнокровия всей ткани печени с расширением просвета междольковых, центральных вен и внутридольковых синусоидов. Очагами обнаружены эритроцитарные «сладжи» и стазы в просвете центральных вен и синусоидов. Гепатоциты, преимущественно в центре долек, находились в состоянии мелковакуольной дистрофии. Отдельно выявлялись группы некротизированных гепатоцитов (рис. 2а). Обратимость патологических процессов подтверждает оценка ткани печени на 14-е сутки после введения 1,0 мг/кг НЧ Мо, когда произошло снижение полнокровия и спад просветов центральных вен и междольковых синусоидов, а также тяжести дистрофических изменений в гепатоцитах. Дистрофия приобрела зернистый и очагами мелковакуольный характер, с преимущественной локализацией в центральной части печёночной дольки (рис. 2б).

Инъекция животным внутривентрально 25,0 мг/кг НЧ Мо (II опытная гр.) через сутки привела к следующим изменениям в гистологической

картине печени крыс: появление пёстрой окраски гистосреза, создаваемой чередованием обширных участков дистрофических изменённых гепатоцитов с очагами ткани, приближенных по гистологии к норме. Гепатоциты в состоянии дистрофии имели мутную гомогенную цитоплазму, местами с мелковакуольными включениями. Границы гепатоцитов стёрлись при сохранении балочного строения. Через 7 суток после введения указанной дозы НЧ Мо вышеописанные изменения были отягощены усилением полнокровия всех структур печени с расширением и междольковых сосудов, центральных вен и внутридольковых синусоидов, а также крупными очагами некрозов гепатоцитов с нарушением балочного строения и потерей границ долек (рис. 2в). На 14-е сут. наблюдения морфологическая картина улучшилась незначительно. По-прежнему наблюдался тяжёлый вакуольный гепатоз. Встречались мелкие, состоящие из нескольких гепатоцитов, очаги некрозов. Балочное строение изменилось. Границы долек стёрлись.

Внутривентральное введение 1,2 мг/кг НЧ MoO_3 (III опытная гр.) уже через сутки отразилось на гистологической характеристике печени животных. Орган приобрёл пёструю окраску: крупные очаги гепатоцитов в состоянии дистрофии и нарушением балочной архитектуры печёночной дольки чередовались с очагами сохранённой структуры печени. Ядра гепатоцитов были увеличены, гиперхромные с крупными ядрышками. По всей поверхности срезов печени выявлялось усиленное полнокровие с расширением просветов центральных вен

и межбалочных синусоидов. Оценка гистосрезов на 7-е сутки после инъекции выявила усиленное полнокровие с развитием стазов в центральных венах, а также обширные участки мелкокапельной дистрофии гепатоцитов (рис. 2г). На 14-е сутки наблюдалось снижение патологических сдвигов. Нарушение кровообращения проявилось в относительно умеренном полнокровии печёночной ткани. Вакуольная дистрофия отмечалась в основном в центральных зонах долек. Как проявление компенсаторных механизмов, наблюдалось усиление функциональной активности неповреждённых гепатоцитов, что проявлялось в увеличении размеров клеток и ядер, а также их гиперхромии.

На 1-е сутки после введения 29,0 мг/кг НЧ MoO_3 (IV опытная гр.) отмечалось полнокровие печени, выраженное во всей портальной системе сосудов. Характер дистрофических изменений гепатоцитов в основном зависел от места локализации в долке. По периферии долек дистрофия была преимущественно зернистая, в центральных частях — мелковакуольная. Границы долек на отдельных участках были стёрты. Выявлялись крупные поля печёночной ткани с сохранением структуры, приближенной к норме, с повышенной активностью гепатоцитов. На 7-е сутки патологические сдвиги прогрессировали. Во всех полях гистологических срезов печени определялось усиленное полнокровие с развитием стазов в центральных венах. Обширные участки дистрофии гепатоцитов распространялись на большую часть печёночных долек. Дистрофия преимущественно носила мелковакуольный характер. 14-е сутки наблюдения демонстрировали усиление в ткани органа некробиотических изменений с развитием тяжёлой диффузной крупнокапельной вакуольной дистрофии и появлением некротизированных групп гепатоцитов (рис. 2д).

Выводы. В результате однократного внутривенного введения НЧ молибдена и его триоксида отмечается снижение абсолютной массы тела и печени у животных, исключение составили животные, получившие MoO_3 в дозе 29 мг/кг. Эти данные перекликаются с результатами исследований некоторых авторов, указывающих на снижении массы тела животных при введении НЧ [11, 12]. Дозы НЧ Мо и MoO_3 и экспозиция времени после инъекции напрямую влияют на уровень повреждения ткани печени и морфологические изменения, обратимость данных процессов.

Гепатотропный эффект обратимого характера показали все изучаемые НЧ, однако введение их в больших дозировках сопровождалось серьёзными патологическими изменениями в структуре печени, что проявлялось в появлении обширных участков крупнокапельного гепатоза и очагов некроза. При введении НЧ в меньших дозировках (1 мг/кг — НЧ Мо и 1,2 мг/кг — НЧ MoO_3) выраженных структурных изменений в гепатоцитах и паренхиме

печени не отмечалось, а умеренное полнокровие, признаки зернистой дистрофии, гипертрофия гепатоцитов и гиперхромия их ядер носили скорее адаптивный характер.

В основе нарушения кровоснабжения органа может лежать и способность НЧ Мо и MoO_3 к агрегации (вследствие развитой удельной поверхности и избыточной поверхностной энергией Гиббса) с последующей эмболией сосудов микроциркуляторного русла печени и развитием гипоксических повреждений клеток [13].

Учитывая накопленные данные по исследованию токсических эффектов НЧ, необходимо принять во внимание и возможность прямого цитотоксического воздействия нанометаллов на клетки организма, в том числе и печени. По мнению ряда авторов [14], прямое действие может быть обусловлено непосредственным действием наноматериала на клетку: механическое повреждение мембраны клетки и/или отдельных её органелл, также снижение её эффективной площади вследствие сорбции наночастиц, накопление в цитоплазме, денатурирующее действие на белки и т.п.

Литература

- Moore MN. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ Int.* 2006; 32:967-76.
- Chen X, Schluesener H J. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *ToxicolLett.* 2008; 176(1):1-12.
- Lovern SB, Strickler JR, Klaper R. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60Hx- C70Hx). *Environ Sci Technol.* 2007; 41(12):4465-70.
- Simonet BM, Valcárcel M. Monitoring nanoparticles in the environment. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393(1):17-21.
- Wei L, Thakkar M, Chen Y, Ntim SA, Mitra S, Zhang X. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *AquatToxicol.* 2010; 100(2):194-201.
- Gong N, Shao K, Feng W, Lin Z, Liang C, Sun Y. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere.* 2011; 83(4):510-6.
- Petersen EJ, Zhang L, Mattison NT, O'Carroll DM, Whelton AJ, Uddin N, Nguyen T, Huang Q, Henry TB, Holbrook RD, Chen KL. Potential release pathways, environmental fate, and ecological risks of carbon nanotubes. *Environ Sci Technol.* 2011; 45(23):9837-56.
- Lapresta-Fernández A, Fernández A, Blasco J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends Anal Chem.* 2012; 32:40-59.
- Fakhri A., Nejad P.A. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic effect of Molybdenum trioxide nanoparticles and application of this for degradation of ketamine under different light illumination. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2016, 159: 211-217 (doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.04.002).
- Zhang W., Shi S., Wang Y., Yu S., Zhu W., Zhang X., Zhang D., Yang B., Wang X., Wang J. Versatile molybdenum disulfide based antibacterial composites for in vitro enhanced sterilization and in vivo focal infection therapy. *Nanoscale.* 2016, 8(22): 11642-11648 (doi: 10.1039/c6nr01243d).
- Fardin Assadi a, Hamid Reza Amirmoghaddami b, MojghanShamseddin c, KeivanNedaei d, AzamHeidari e / Effect of Molybdenum Trioxide Nanoparticles (MoO_3 NPs) on Thyroid Hormones in Female Rats *Journal of Human / Environment and Health Promotion.* 2016; 1(4):189-195.
- Asadi F, Mohseni M, Dadashi N K, et al. / Effect of Molybdenum nanoparticles on blood cells, liver enzyme and sexual hormones in male rats / *Biological Trace Element Research.* 2016.
- Griffitt R.J., Weil R., Hyndman K.A., Denslow N.D., Powers K., Taylor D., Barber D.S. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in Zebrafish (*Danio rerio*) // *Environ Sci Technol.* 2007. V. 41(23). P. 8178-860.
- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO , CuO and TiO_2 to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* // *Chemosphere.* 2008. V. 71(7). P. 1308-16.