

**ТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ УЛЬТРАДИСПЕРСНЫХ ФОРМ
МЕТАЛЛОВ (Mo и MoO₃) В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *in vivo****Е.В. ШЕЙДА^{1, 2} ✉, Е.А. РУСАКОВА^{1, 2}, О.Ю. СИПАЙЛОВА³, Е.А. СИЗОВА^{1, 2},
С.В. ЛЕБЕДЕВ^{1, 2}

Несмотря на возрастающие объемы применения наночастиц (НЧ) в промышленности, существует серьезная нехватка информации относительно их воздействия на здоровье человека и окружающую среду. Так, наноматериалы на основе молибдена привлекают внимание из-за сверх-высокой удельной площади поверхности и уникальных оптических, электронных, каталитических и механических свойств, однако, обладая высокой проникающей способностью, молибден может в избытке накапливаться в органах и тканях организма, влияя на их структурную целостность и функциональную активность. В настоящей работе у подопытных крыс впервые установлен гепатотропный эффект наночастиц Mo и MoO₃ на основании оценки степени активации маркера апоптоза каспазы 3, отмечено снижение двигательной активности и подавление эмоционального состояния животных, а также зафиксировано снижение массы их тела и печени на фоне увеличения массы головного мозга при однократном внутрибрюшинном введении НЧ. Нашей целью было изучение общего воздействия наночастиц Mo и MoO₃ на рост и развитие внутренних органов крыс, особенности изменения двигательной и эмоциональной активностей животных, а также оценка их гепатотропного эффекта на основании оценки степени активации маркера апоптоза каспазы 3. Биомедицинские исследования проводили на 30 белых крысах-самцах линии Wistar массой 110-180 г. В качестве источников микроэлементов использовали НЧ Mo и MoO₃, полученные методом плазмохимического синтеза. Экспериментальные животные были разделены на пять групп ($n = 6$). Крысам I и II опытных групп однократно внутрибрюшинно вводили НЧ Mo в дозе 1,0 и 25,0 мг/кг; животным III и IV опытных групп — НЧ MoO₃ в дозе 1,2 и 29,0 мг/кг. Особям из контрольной группы в течение эксперимента вводили изотонический раствор хлорида натрия (0,9 % NaCl) в эквивалентном объеме. По окончании эксперимента (на 14-е сут) крыс декапитировали под нембуталовым наркозом. Проводили анатомическую разделку и взвешивание внутренних органов (печень и головной мозг). В течение опыта ежесуточно контролировали рост всех особей посредством индивидуального взвешивания. Полученные данные были использованы для учета изменений абсолютной массы тела и расчета соотношения массы исследуемых органов к массе тела. Для выявления готовности клеток печени к запрограммированной клеточной гибели иммуногистохимически выявляли каспазу 3 («Biocare Medical, LLC», США) в цитоплазме и ядрах гепатоцитов при окрашивании срезов. Тест «открытое поле» использовали для оценки эмоциональной, двигательной активности и поведения экспериментальных животных. Эмоциональный фактор оценивали по степени тревожности и страха (числу фекальных болюсов), а также грумингу (число причесываний, умываний и прочих элементов ухода). Система Инфракрасный актиметр в комплекте с системой Панель с отверстиями (ACT-01, «Orchid Scientific & Innovative India Pvt. Ltd.», Индия) позволила оценить спонтанную двигательную активность (ДА) животных. Эксперименты выявили токсическое воздействие наночастиц Mo и MoO₃ на функционирование некоторых систем организма, в частности было установлено снижение массы тела и печени крыс на фоне увеличения массы головного мозга. Максимальное снижение массы тела зафиксировали у животных, получавших 25,0 мг/кг Mo и 1,2 мг/кг MoO₃. К достоверному снижению ($p \leq 0,05$) массы печени приводило введение НЧ Mo как в низкой, так и в высокой дозе (соответственно на 14,3 и 16,1 %) и MoO₃ в дозе 1,2 мг/кг (на 33,5 %). Введение Mo в дозе 1,0 мг/кг, 25 мг/кг и MoO₃ в дозе 1,2 мг/кг вызывало достоверное ($p \leq 0,05$) увеличение массы головного мозга соответственно на 10,9; 3,85 и 5,49 %. Увеличение массы головного мозга, возможно, за счет отечности органа, приводило к изменению поведенческих реакций и двигательной активностей крыс, что свидетельствовало о нейротоксическом действии НЧ Mo и MoO₃, степень выраженности которого напрямую зависела от времени после введения и дозировки частиц. Было отмечено снижение ДА крыс на 1-е и 7-е сут после введения Mo, причем активность снижалась с увеличением дозировки (чем выше дозировка, тем ниже активность). Наименьшие показатели ДА были получены на 14-е сут после введения 29,0 мг/кг MoO₃. Эмоциональная активность крыс снижалась при введении НЧ Mo и MoO₃ во всех изученных дозировках, наибольший эффект был зафиксирован на 1-е и 7-е сут эксперимента. Иммуногистохимическая реакция с маркером апоптоза каспазой 3 выявила усиление экспрессии этого фермента в клетках печени самцов крыс линии Wistar при введении им наночастиц Mo и

* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 20-16-00078.

MoO₃. Обнаруженная активация маркера зависела не только от дозы и времени после инъекции, но и от степени деструктивных изменений в органе на фоне введения НЧ. Более тяжелые поражения печени, наблюдаемые при введении НЧ, сопровождались более слабой активацией каспазы 3 по сравнению с контролем.

Ключевые слова: наночастицы, крысы, каспаза 3, апоптоз, внутренние органы, головной мозг, поведение, двигательная активность, эмоциональность.

В последнее время количество экспериментальных исследований по оценке токсичного действия ультрадисперсных частиц значительно отстает от интенсивного развития нанотехнологий. Несмотря на возрастающие объемы применения наночастиц (НЧ) в промышленности, существует серьезная нехватка информации относительно их воздействия на здоровье человека и окружающую среду (1-3). Все большую актуальность приобретает изучение биологического действия и токсических эффектов наноразмерных частиц различного происхождения на клетки и ткани организма (4-6). В исследованиях *in vivo* и *in vitro* показано развитие аллергических реакций у потомства мышей, интраназально инсулированных диоксидом титана вдыхаемого размера (TiO₂), неблагоприятное влияние нанодисперсных частиц на сперматогенез и гистопатологические изменения в яичках, а также изменения в экспрессии генов в мозге потомства мышей после подкожной инъекции наночастиц TiO₂ материнским особям (4).

Наночастицы разных размеров, такие как серебро (Ag; 15, 100 нм), молибден (MoO₃; 30, 150 нм), алюминий (Al; 30, 103 нм), оксид железа (Fe₃O₄; 30, 47 нм) и диоксид титана (TiO₂; 40 нм), также прошли оценку на потенциальную токсичность при изучении морфологических параметров клеток методом световой микроскопии. Показано, что митохондриальная функция значительно снижалась в клетках, подвергшихся воздействию 5-50 мкг/мл наночастиц Ag. Однако Fe₃O₄, Al, MoO₃ и TiO₂ не оказывали заметного влияния при более низких дозах (10-50 мкг/мл), тогда как при более высоких (100-250 мкг/мл) наблюдался значительный эффект. Согласно результатам микроскопии, клетки, подвергшиеся воздействию наночастиц в более высоких дозах, становились аномальными по размеру, уменьшаясь и приобретая неправильную форму. Было показано значительное истощение содержания глутатиона, снижение потенциала митохондриальной мембраны и повышение количества активных форм кислорода, то есть цитотоксичность Ag (15, 100 нм) в клетках печени, вероятно, будет опосредована окислительным стрессом (5). Также в ряде исследований установлено токсическое влияние наночастиц на нервную систему в целом и на головной мозг потомства при их переносе из тела матери в систему кровообращения и тело плода (6, 7).

Молибден (Mo) — один из важнейших химических элементов в живом организме. Он входит в состав ксантиноксидазы, альдегидоксидазы и сульфитоксидазы (8, 9), участвует в метаболизме белков, обмене серы (10), а также транспортировке и выведении железа (11). Наноматериалы на основе молибдена в последнее время привлекают внимание из-за сверхвысокой удельной площади поверхности и уникальных оптических, электронных, каталитических и механических свойств (12-14). В живом организме НЧ молибдена обладают высокой проникающей способностью и могут накапливаться в избыточном количестве, выступая при этом антагонистами других жизненно важных элементов, в частности меди, дефицит которой оказывает влияние на функциональную активность кровеносной системы (15, 16). В то же время наноразмерный Mo может стать

защитой от воздействия повышенных концентраций тяжелых металлов, например Cd и Hg. Было высказано предположение, что Na_2MoO_4 способен снимать острую токсичность CdCl_2 у крыс и защитный механизм этого металла частично связан с усилением индукции синтеза Cd-металлотионеина в печени (17). Накопление Cd в тканях овец уменьшилось по мере увеличения количества Mo и серы в рационе (18, 19).

В настоящей работе у подопытных крыс нами впервые установлен гепатотропный эффект наночастиц Mo и MoO_3 , который выражался в повышении эндогенного уровня маркера апоптоза — каспазы 3. При этом отмечено снижение двигательной активности и подавление эмоционального состояния животных, а также зафиксировано снижение массы их тела и печени на фоне увеличения массы головного мозга при однократном внутривентральном введении НЧ Mo и MoO_3 .

Нашей целью было изучение общего воздействия наночастиц Mo и MoO_3 на рост и развитие внутренних органов крыс, на двигательную и эмоциональную активность животных, а также установление гепатотропного эффекта наночастиц на основании оценки экспрессии маркера активированной каспазы 3 как показателя развития апоптоза в клетках печени.

Методика. Биомедицинские исследования проводили на 90 самцах крыс линии Wistar массой 110–180 г. Экспериментальная модель была выбрана согласно методическим рекомендациям «Оценка безопасности наноматериалов» (утверждено приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 12 октября 2007 года № 280; <https://www.rags.ru/stroyka/text/52003/#i396117>), а также методическим указаниям (20). До начала эксперимента животные содержались в условиях лаборатории биологических испытаний и экспертиз ФНЦ Биологических систем и агротехнологий РАН на стандартном рационе для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92) согласно требованиям лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ 51000.4-96). Экспериментальные исследования проводились в рамках требований гуманного обращения с животными (21), с подтверждением этического комитета (протокол № 3).

В качестве источников микроэлементов использовали НЧ Mo и MoO_3 , полученные методом плазмохимического синтеза. Размеры частиц оценивали на основе измерений удельной поверхности на приборе Sorbi®-M (ООО «МЕТА», Россия). Микроструктуру порошков анализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Philips CM-30 («Philips», Япония). Для определения фазового состава использовали дифрактометр Rigaku D/MAX-2200VL/PC («Rigaku Corporation», Япония), излучение Cu K α . При получении лиозолей водные взвеси НЧ Mo и MoO_3 обрабатывали ультразвуком на диспергаторе УЗДН-2Т («НПП Академприбор», Россия) при 35 кГц, 300/450 Вт, 10 мкА в течение 30 мин. Полученные лиозоли НЧ использовали для инъекций.

Экспериментальных крыс разделили на пять групп (по $n = 18$) и содержали в одинаковых условиях на стандартном сбалансированном рационе для лабораторных животных. Контрольную и опытные группы формировали из особей одного возраста. Разброс по исходной массе не превышал 10 %. Крысам I и II опытных групп однократно внутривентральным введением НЧ Mo в дозе 1,0 и 25,0 мг/кг; животным III и IV опытных групп — НЧ MoO_3 в дозе 1,2 и 29,0 мг/кг. Животным контрольной группы в течение

эксперимента вводили изотонический раствор хлорида натрия (0,9 % NaCl) в эквивалентном объеме. Выбранные концентрации ультрадисперсных частиц находились в пределах максимально переносимых доз для исследуемого металла. На 1-е, 7-е и 14-е сут эксперимента крысы декапитировали под нембуталовым наркозом. После этого проводили анатомическую разделку для отбора проб печени для морфологического анализа. Учет изменений массы внутренних органов (печень и головной мозг) осуществляли на 14-е сут эксперимента.

Ежесуточно контролировали рост экспериментальных особей посредством индивидуального взвешивания утром до кормления (погрешность ± 2 г). Полученные данные были использованы для учета изменений абсолютной массы тела и расчета соотношения массы исследуемых органов к массе тела.

Кусочки печени фиксировали в 10 % нейтральном формалине и заливали в парафиновую смесь HistoMix (ООО «БиоВитрум», Россия). Для выявления готовности клеток печени к запрограммированной клеточной гибели иммуногистохимически выявляли экспрессию фермента каспазы 3 в цитоплазме и ядрах гепатоцитов в процессе окраски срезов в соответствии со стандартной процедурой, рекомендованной производителем набора («Bioscare Medical, LLC.», США; антитела к каспазе 3). Подсчет иммунопозитивных клеток проводили из расчета на 1000 клеток и выражали в % (светооптический микроскоп МТ 5300L, «Meiji Techno Co., Ltd», Япония).

Поведенческие тесты проводили на 1-е, 7-е и 14-е сут с утра до кормления животных. Тест «открытое поле» использовали для оценки эмоциональной, двигательной активности и поведения экспериментальных животных. Эмоциональный фактор оценивали по степени тревожности и страха (числу фекальных болюсов), а также грумингу (числу причесываний, умываний и прочих элементов ухода).

Спонтанную двигательную активность (ДА) животных оценивали с помощью система Инфракрасный актиметр в комплекте с системой Панель с отверстиями (АСТ-01, «Orchid Scientific & Innovative India Pvt. Ltd.», Индия). Движения и проявление любопытства регистрировали с помощью системы инфракрасных датчиков при свободном перемещении животных по панели с 16 отверстиями. Крысы пересекали отверстия или погружались в них, при этом пересечения и погружения регистрировалось датчиками по преломлению лучей в плоскостях X и Y.

Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica 10.0 («StatSoft, Inc.», США). Результаты представлены в виде средних арифметических значений (M) и их стандартных ошибок ($\pm SEM$). Достоверность различий сравниваемых показателей определяли по t -критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. Наночастицы Mo, использованные в работе, содержали не менее 99,7 % Mo и 0,30 % O₂, их размер составлял $50,0 \pm 0,56$ нм, удельная поверхность — 14,0 м²/г. Для НЧ MoO₃ показатели были следующими: 99,8 % MoO₃ и 0,20 % O₂, $92,0 \pm 0,54$ нм, 12,0 м²/г.

Введение НЧ Mo в концентрациях 1,0 и 25,0 мг/кг (I и II опытные группы) сопровождалось снижением массы тела на 14-е сут исследования (MT) соответственно на 2,14 и 7,04 % по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). Аналогичная тенденция сохранялась при воздействии НЧ MoO₃ в дозах 1,2

и 29,0 мг/кг (III и IV группы) — отмечали снижение МТ на 6,41 и 1,51 % ($p \leq 0,05$) относительного контрольного аналога (см. рис. 1, А). Масса печени (МП) под влиянием Мо в I и II опытных группах достоверно уменьшалась на 14,3 и 16,1 % ($p \leq 0,05$), под действием МоО₃ (III группа) это снижение было максимальным (на 33,5 %) ($p \leq 0,05$), в то время как в IV группе наблюдалось увеличение МП на 21,6 % ($p \leq 0,05$) относительно контрольной группы (см. рис. 1, Б). Максимальное соотношение МП/МТ отмечали при концентрации НЧ МоО₃ 29,0 мг/кг, что в количественном выражении было на 23,4 % больше относительно контрольного аналога. Незначительное снижение МП/МТ (на 9,80 %) вызывала концентрация НЧ Мо 25,0 мг/кг. Максимальное уменьшение этого показателя (на 29,0 %) установили при концентрации НЧ МоО₃ 1,2 мг/кг (см. рис. 1, В).

Концентрация НЧ Мо 1,0 мг/кг приводила к максимальному (на 10,9 % ($p \leq 0,05$)) увеличению массы головного мозга (МГМ) крыс. Во II и IV опытных группах наблюдалось равномерное увеличение МГМ на 3,85 и 5,49 % ($p \leq 0,05$), в отличие от III группы, где масса МГМ снижалась на 1,10 % по сравнению с контролем (см. рис. 1, Г). Максимальное соотношение МП/МГМ отмечали при концентрации НЧ Мо 1,0 мг/кг, что в количественном выражении оказалось на 13,4 % ($p \leq 0,05$) больше, чем в контроле. Тенденция к увеличению соотношения МП/МГМ сохранялась во II (на 11,7 %), III (на 5,67 %) и IV (на 7,11 %) группах ($p \leq 0,05$) (см. рис.1, Д).

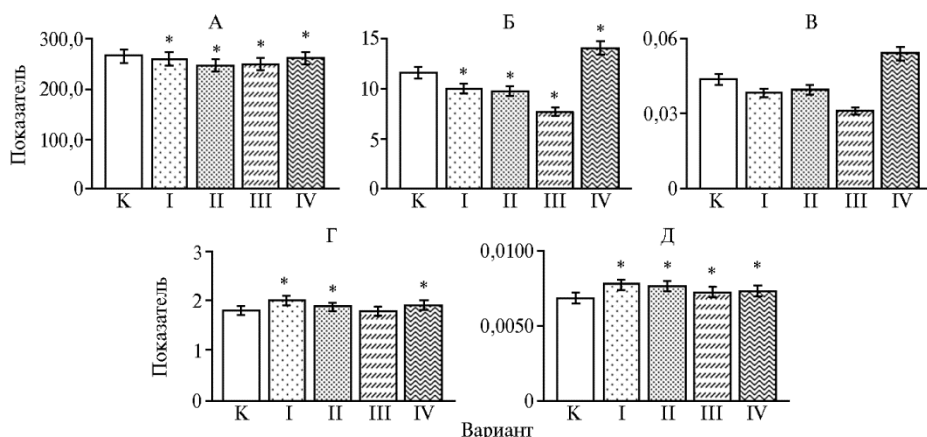


Рис. 1. Масса тела, г (А), печени, мг (Б), отношение массы печени к массе тела, мг/г (В), масса головного мозга, мг (Г) и отношение массы головного мозга к массе тела, мг/г (Д) у самцов крыс линии Wistar на 14-е сут после внутрибрюшинного введения разных форм наночастиц молибдена: К — контроль, I — Мо, 1,0 мг/кг; II — Мо, 25,0 мг/кг; III — МоО₃, 1,2 мг/кг; IV — МоО₃, 29,0 мг/кг ($n = 6$, $M \pm SEM$).

* Различия при сравнении с контрольной группой статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Каспаза 3 — один из ферментов, участвующих в развитии апоптоза (22), который, в свою очередь, выступает фундаментальным и общебиологическим механизмом, ответственным за поддержание постоянства численности клеток, а также за их формообразование и выбраковку дефектных клеток. Экспрессия каспазы 3 служит маркером активации апоптоза (23), который может быть выявлен иммуногистохимически с использованием специфических антител. В наших опытах при иммуногистохимическом исследовании активации каспазы 3 была обнаружена зависимость экспрессии маркера апоптоза от вводимой дозы НЧ Мо и МоО₃, а также от времени, прошедшего после инъекции (рис. 2).

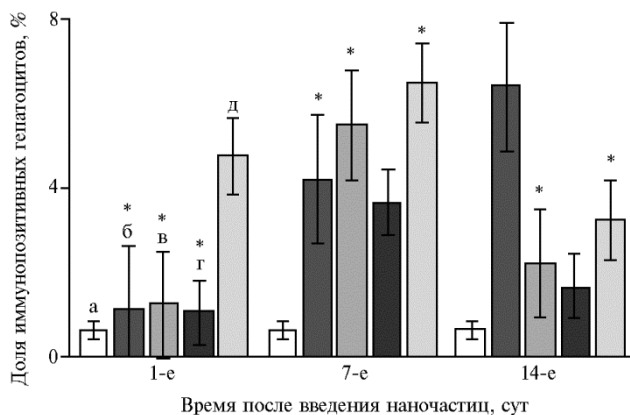


Рис. 2. Экспрессия антигена активированной каспазы 3 в клетках печени самцов крыс линии Wistar в зависимости от времени после внутрибрюшинного введения разных форм наночастиц молибдена: а — контроль; б — Мо, 1,0 мг/кг; в — Мо, 25,0 мг/кг; г — МоО₃, 1,2 мг/кг; д — МоО₃, 29,0 мг/кг ($n = 6$, $M \pm SEM$). * Различия при сравнении с контрольной группой статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Подсчет иммуно-
позитивных гепатоцитов
показал, что внутрибрю-
шинное введение НЧ Мо в дозе 1,0 и 25,0 мг/кг индуцировало в клетках апоптотические изменения, особенно на 7-е сут после инъекции и при повышенной дозе ($p \leq 0,05$) (рис. 3, А). На 14-е сут наблюдался обратный эффект — наибольшая экспрессия проапоптического белка отмечалась в группе животных, которые получили меньшее количество НЧ, несмотря на лучшее морфофункциональное состояние печени в этот период (см. рис. 3, Б) (24). Видимо, на это повлияло образование большего количества необратимо поврежденных участков органа у крыс, которым ввели более высокую дозу НЧ Мо (25,0 мг/кг).

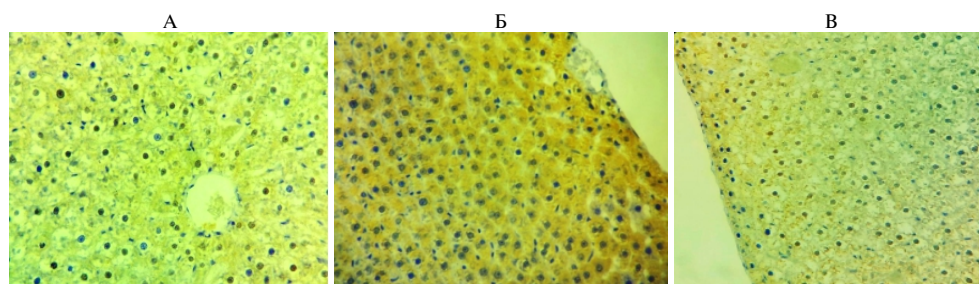


Рис. 3. Микрофотографии гепатоцитов у самцов крыс линии Wistar при внутрибрюшинном введении разных форм наночастиц молибдена: А — 1-е сут после введения Мо (1,0 мг/кг), экспрессия активированной каспазы 3 в ядрах и цитоплазме гепатоцитов (желто-коричневое окрашивание) по периферии долек под капсулой; Б — 7-е сут после введения Мо (25,0 мг/кг), экспрессия активированной каспазы 3 в ядрах и цитоплазме гепатоцитов перипортальной зоны; В — 14-е сут после введения МоО₃ (29 мг/кг), слабо выраженная экспрессия активированной каспазы 3 в ядрах и цитоплазме гепатоцитов по периферии долек под капсулой (увеличение $\times 400$, светооптический микроскоп МТ 5300L, «Meiji Techno Co., Ltd», Япония).

Повышение дозы НЧ МоО₃ в IV группе вызывало усиление экспрессии активированной каспазы 3 в большей степени по сравнению с III и контрольной группами во все сроки исследования, достигая максимального показателя через 7 сут после введения. Можно отметить, что на фоне усиления некробиотических процессов в ткани печени на 14-е сут в IV группе степень активации проапоптического маркера снижалась с локализацией слабоокрашенных иммунопозитивных гепатоцитов преимущественно по периферии долек под капсулой (см. рис. 3, В).

Изменения двигательной активности подопытных животных при исследовании в системе «инфракрасный актиметр» соответствовали данным, полученным в тесте «открытое поле». Да на 1-е и 7-е сут эксперимента в

опытных группах снижалась: чем выше была дозировка введенного Мо, тем ниже оказывалась ДА. На 14-е сут ДА в I и II опытных группах, напротив, была выше относительно контроля. При введении НЧ МоО₃ ДА в опытных группах снижалась по сравнению с контролем, причем в большей степени в группах с наибольшей дозировкой и продолжительностью воздействия (на 14-е сут).

Степень тревожности и страха в 1-е сут исследования была наибольшей у животных контрольной группы, наименьшей — в I опытной группе (на 86 %) ($p \leq 0,05$). Частота груминга во II группе была на 89 % ($p \leq 0,05$) ниже, чем в контроле. На 7-е сут эксперимента показатель, характеризующий эмоциональное состояние, снизился относительно контроля на 32 % в I группе и на 48 % — во II группе. Суммарные показатели груминга оказались в I и во II группе достоверно ниже, чем в контроле, — соответственно на 83 и 92 % ($p \leq 0,05$). К окончанию эксперимента показатели в группах, получавших ультрадисперсные частицы молибдена, были ниже относительно контроля на 22 %.

При введении животным НЧ МоО₃ степень эмоциональной активности (груминг, дефекация) в опытных группах в 1-е сут эксперимента снизилась в III и IV группах относительно контроля соответственно на 52 и 69 % ($p \leq 0,05$). На 7-е сут также наблюдали подавление эмоциональной активности, причем, как и в 1-е сут после введения НЧ МоО₃, большее снижение отмечалось у животных, которым вводили МоО₃ в меньшей дозировке. На 14-е сут после введения наночастиц эмоциональная активность как в III, так и в IV группе по-прежнему снижалась относительно контроля (соответственно на 33 и 22 %, $p \leq 0,05$).

Лабораторные крысы — наиболее распространенный вид экспериментальных животных для разработки моделей последствий острых и хронических интоксикаций. В настоящее время выведено более 100 отдельных аутбредных стоков и инбредных линий лабораторных крыс. Чаще всего при токсикологических исследованиях используются крысы стоков Wistar, Bio Breeding Sprague-Dawley, C57BL, CFI, C3H. В своих исследованиях токсического воздействия ультрадисперсных частиц молибдена и его оксида в качестве биомодели нами были выбраны самцы крыс линии Wistar. Ранее показано, что однократное внутрибрюшинное введение НЧ Мо и МоО₃ приводило к морфологическим изменениям ткани печени у подопытных животных этой линии, степень выраженности которых (от адаптивных до некробиотических) и обратимость зависели от дозы и времени, прошедшего после инъекции. Увеличение дозы НЧ сопровождалось значительными патологическими сдвигами в виде появления обширных участков крупновакуольного гепатоза и/или очагов некроза, причем в наибольшей степени повреждающее воздействие на ткань печени оказали НЧ МоО₃ (24).

Можно предположить, что в основе патоморфологических сдвигов в печени на фоне поступления НЧ Мо и МоО₃ лежит их непосредственное деструктивное воздействие на сосудистую систему организма животных и, как следствие, развитие тканевой гипоксии и некробиотических изменений. Это предположение основывается на результатах исследований З.Х. Шерхова с соавт. (25), которые установили влияние избытка Мо, введенного крысам *per os* в форме соли (Na₂MoO₄ · 2H₂O), на сосудистую систему, в том числе в печени. Несмотря на то, что в наших исследованиях Мо вводился в наноформе, а не в составе соли, полученные результаты могут быть сопостав-

лены, поскольку не исключена вероятность частичного перехода НЧ во внутренней среде организме в ионную форму (26, 27).

В свою очередь, деструктивные изменения в клетках могут приводить к активации системы мононуклеарных фагоцитов, активно захватывающих и накапливающих наноразмерные частицы (24), к развитию воспаления, а также, возможно, к индукции апоптоза в ткани печени, а именно к активации проапоптотического белка каспазы 3 (28), выявленной нами в печени крыс экспериментальных групп.

Обладая высокой проникающей способностью, НЧ оказывают влияние на органы и системы организма, в том числе на нервную. При наблюдении за крысами, которым вводили НЧ, мы обнаружили признаки интоксикации нервной системы, в частности угнетение двигательной активности и увеличение массы головного мозга. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии привыкания у животных, получавших НЧ молибдена и его оксида. Ранее нами показано токсическое воздействие ультрадисперсных частиц железа, титана и диоксида титана на проявление когнитивных функций у животных и морфологическую структуру головного мозга, что подтверждает данные других исследователей об увеличении абсолютной массы головного мозга и изменении эмоционального состояния животных под влиянием НЧ металлов микроэлементов (29-31).

Таким образом, проведенный иммуногистохимический анализ выявил усиление экспрессии маркера апоптоза — фермента каспазы 3 в гепатоцитах самцов крыс линии Wistar при введении им наночастиц (НЧ) Мо и МоО₃. Обнаруженная активация зависела не только от дозы и времени после инъекции, но и от степени деструктивных изменений в органе на фоне введения НЧ. Более тяжелые поражения печени сопровождались более слабой активацией проапоптотического фермента по сравнению с контролем. Возможной причиной этого было развитие обширных некробиотических процессов в ткани органа без инициации апоптотной гибели клеток. НЧ Мо и МоО₃ оказывали токсическое воздействие на функционирование некоторых систем организма. Максимальное снижение массы тела было зафиксировано у животных, получавших Мо в дозе 25,0 мг/кг и МоО₃ в дозе 1,2 мг/кг. К достоверному снижению массы печени приводило введение НЧ Мо как в низкой, так и высокой дозе (на 14,3 и 16,1 %) и МоО₃ в дозе 1,2 мг/кг (на 33,5 %). Введение Мо в дозах 1,0 мг/кг, 25 мг/кг и МоО₃ в дозе 1,2 мг/кг вызывало достоверное увеличение массы головного мозга (соответственно на 10,9; 3,85 и 5,49 %, $p \leq 0,05$). В свою очередь, увеличение массы головного мозга (возможно, за счет отека органа) приводило к изменению поведенческих реакций и двигательной активности (ДА) крыс, что свидетельствовало о нейротоксическом действии НЧ Мо и МоО₃, степень выраженности которого напрямую зависела от времени после введения и дозировки частиц. Отмечалось снижение ДА крыс на 1-е и 7-е сут после введения Мо, причем активность сильнее подавлялась с увеличением дозировки (чем выше дозировка, тем ниже активность). Наименьшие значения показателей, характеризующих ДА, были получены на 14-е сут после введения НЧ МоО₃ в дозе 29,0 мг/кг. Показано, что эмоциональная активность крыс снижалась при введении НЧ Мо и МоО₃ во всех изученных дозировках, при этом наибольший эффект от воздействия наночастиц зафиксировали на 1-е и 7-е сут эксперимента.

1ФГБОУ Оренбургский государственный университет,
460018 Россия, г. Оренбург, пр. Победы, 13,
e-mail: elena-shejjda@mail.ru ✉, elenka_rs@mail.ru, sizova.178@yandex.ru,
Lsv@list.ru;

Поступила в редакцию
15 июля 2020 года

*²ФГБНУ ФНЦ Биологических систем
и агротехнологий РАН,
460000 Россия, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29;
³ФГБОУ ВО Оренбургский государственный
медицинский университет,
460000 Россия, г. Оренбург, ул. Советская, 6,
e-mail: osipaylova@mail.ru*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2020, V. 55, № 6, pp. 1171-1181

TOXIC EFFECTS OF ULTRA-DISPERSED FORMS OF METALS (Mo AND MoO₃) IN THE EXPERIMENT *in vivo*

*E.V. Sheida^{1, 2} ✉, E.A. Rusakova^{1, 2}, O.Yu. Sipaylova³, E.A. Sizova^{1, 2},
S.V. Lebedev^{1, 2}*

*¹Orenburg State University, 13, prosp. Pobedy, Orenburg, 460018 Russia, e-mail elena-shejida@mail.ru (✉ corre-
sponding author), elenka_rs@mail.ru, sizova.178@yandex.ru, Lsv@list.ru;*

²Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies RAS, 29, ul. 9 Yanvarya, Orenburg, 460000;

³Orenburg State Medical University, 6, ul. Sovetskaya, Orenburg, 460000 Russia, e-mail osipaylova@mail.ru

ORCID:

Sheida E.V. orcid.org/0000-0002-2586-613X

Sizova E.A. orcid.org/0000-0002-5125-5981

Rusakova E.A. orcid.org/0000-0002-1622-1284

Lebedev S.V. orcid.org/0000-0001-9485-7010

Sipaylova O.Yu. orcid.org/0000-0003-0243-6249

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially from the Russian Science Foundation, grant No. 20-16-00078

Received July 15, 2020

doi: 10.15389/agrobiol.2020.6.1171eng

Abstract

Despite the increasing use of nanoparticles (NPs) in industry, there is a serious lack of information regarding their impact on human health and the environment. Thus, nanomaterials based on molybdenum attract attention due to their ultra-high specific surface area and unique optical, electronic, catalytic and mechanical properties. However, having a high penetrating ability, molybdenum can accumulate in excess in organs and tissues of the body, affecting their structural integrity and functional activity. In the present work, the hepatotropic effect of Mo and MoO₃ nanoparticles was first established in experimental rats based on an assessment of the degree of activation of the apoptosis marker, a decrease in the level of motor activity and suppression of the emotional state of animals. A decrease in the body weight of rats and liver weight was recorded as a result of a single intraperitoneal injection of NPs while an increase in brain weight occurred. Our goal was to investigate general effects of Mo and MoO₃ nanoparticles on the growth and development of the internal organs of rats, the peculiarities of their motor and emotional activities, and the hepatotropic effect of the nanoparticles based on the assessment of the Caspase 3 (Cleaved) expression in the cytoplasm and nuclei of liver cells. Biomedical studies were carried out with 30 white Wistar male rats weighing 110-180 g. Mo and MoO₃ NPs were produced by plasma-chemical synthesis. The experimental animals were divided into five groups ($n = 6$ each). For NPs administration, the rats of groups I and II were intraperitoneally once-injected with Mo at 1.0 and 25.0 mg/kg, respectively, and animals of experimental groups III and IV were once-injected with MoO₃ at 1.2 and 29.0 mg/kg, respectively. Animals of the control group were injected with isotonic sodium chloride solution (0.9 % NaCl) in an equivalent volume. The growth of the experimental individuals was monitored daily by individual weighing. At the end of the experiment (day 14), the rats were decapitated under Nembutal anesthesia. Anatomical dissection and weighing of internal organs (liver and brain) were carried out. The absolute and average daily gains were calculated, as well as the weight ratio of the studied organs to the body. To reveal the readiness of liver cells for programmed cell death, expression of caspase 3 (Biocare Medical, LLC, USA) in the cytoplasm and nuclei of hepatocytes was detected immunohistochemically on the stained sections. The open field test was used to assess the emotional, motor activity and behavior of experimental animals. The emotional factor was assessed by the degree of anxiety and fear (the number of fecal boluses), as well as grooming (the number of brushing, washing, and other care elements). A system "Infrared actimeter" with "Panel with holes" (ACT-01, Orchid Scientific & Innovative India Pvt. Ltd., India) was used to assess spontaneous locomotor activity (LMA) of animals. It was shown that Mo and MoO₃ NPs have a toxic effect on the normal functioning of some body systems. In particular, the body weight of rats and the weight of their liver decrease while the weight of the brain increases. It was found out that the maximum decrease in body weight occurs in animals that received Mo at a dose of 25.0 mg/kg and MoO₃ at 1.2 mg/kg. Mo NPs in both low and high doses provoked a significant decrease in liver weight (by 14.3 and 16.1 %) ($p \leq 0.05$), and MoO₃ NPs at 1 mg/kg caused a 33.5 % decrease. The injections of Mo NPs at 1.0 mg/kg and 25 mg/kg, and MoO₃ NPs at 1.2

mg/kg led to a significant ($p \leq 0.05$) increase in brain weight (by 10.9, 3.85, and 5.49 %, respectively). This increase is possibly due to edema of the organ, which affects behavioral reactions and motor activities in rats, indicating the neurotoxic effect of Mo and MoO₃ NPs. Its severity directly depends on time of exposure and particle dosage. There was a decrease in LMA of rats on days 1 and 7 after Mo administration, and the higher the dosage, the lower the activity. The level of locomotor activity decreased to the lowest level on day 14 after administration of 29.0 mg/kg MoO₃ NPs. The level of emotional activity was lower for all applied dosages of Mo and MoO₃ NPs, and the effect was maximum on days 1 and 7. Evaluation of immunohistochemical expression of activated caspase 3 as a marker of apoptosis in the test with cleaved caspase 3 antibodies revealed an increase in endogenous levels of a larger fragment (p17) of the caspase 3 proenzyme in hepatocytes of male Wistar rats upon administration of Mo and MoO₃ NPs. This confirms the hepatotropic properties of the Mo and MoO₃ NPs. The detected caspase 3 activation depended not only on the dosage and time after injection of NPs, but also on the lesions caused by the NPs. More severe liver lesions occurred when caspase 3 activation was lower compared to control.

Keywords: nanoparticles, rats, caspase 3, apoptosis, internal organs, brain, behavior, locomotor activity, emotionality.

REFERENCES

1. Bonner J.C. Nanoparticles as a potential cause of pleural and interstitial lung disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2010, 7(2): 138-141 (doi: 10.1513/pats.200907-061RM).
2. Rossi E.M., Pyllkkänen L., Koivisto A.J., Vippola M., Jensen K.A., Miettinen M., Sirola K., Nykäsenoja H., Karisola P., Stjernvall T., Vanhala E., Kiilunen M., Pasanen P., Mäkinen M., Hämeri K., Joutsensaari J., Tuomi T., Jokiniemi J., Wolff H., Savolainen K., Matikainen S., Alenius H. Airway exposure to silica coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicological Sciences*, 2010, 113(2): 422-433 (doi: 10.1093/toxsci/kfp254).
3. Sperling R.A., Parak W.J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2010, 368(1915): 1333-1383 (doi: 10.1098/rsta.2009.0273).
4. Asadi F., Mohseni M., Noshahr K.D., Soleymani F.H., Jalilvand A., Heidari A. Effect of molybdenum nanoparticles on blood cells, liver enzymes, and sexual hormones in male rats. *Biological Trace Element Research*, 2017, 175(1): 50-56 (doi: 10.1007/s12011-016-0765-5).
5. Ema M., Kobayashi N., Naya M., Hanai S., Nakanishi J. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reproductive Toxicology*, 2010, 30(3): 343-352 (doi: 10.1016/j.reprotox.2010.06.002).
6. Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro*, 2005, 19(7): 975-983 (doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.034).
7. Umezawa M., Onoda A., Takeda K. Developmental toxicity of nanoparticles on the brain. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 2017, 137(1): 73-78 (doi: 10.1248/yakushi.16-00214).
8. Mahler H.R., Mackler B., Green D.E., Bock R.M. Studies on metaloflavo proteins III. Aldehyde oxidase, a molybdoflavoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 1954, 210(1): 465-480.
9. Cohen H.J., Fridovich I., Rajagopalan K.V. Hepatic sulphite oxidase, a functional role for molybdenum. *The Journal of Biological Chemistry*, 1971, 246(2): 374-382.
10. Underwood E.J. *Trace elements in human and animal nutrition*. 3rd ed. Academic Press, New York, 1971.
11. Seelig M.S. Review: Relationships of copper and molybdenum to iron metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1972, 25(10): 1022-1037 (doi: 10.1093/ajcn/25.10.1022).
12. Eremin A., Gurentsov E., Kolotushkin R., Musikhin S. Room-temperature synthesis and characterization of carbon-encapsulated molybdenum nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, 2018, 103: 186-196 (doi: 10.1016/j.materresbull.2018.03.026).
13. Gu S., Qin M., Zhang H., Ma J., Qu, X. Preparation of Mo nanopowders through hydrogen reduction of a combustion synthesized foam-like MoO₂ precursor. *International Journal of Refractory Metals & Hard Materials*, 2018, 76: 90-98 (doi: 10.1016/J.IJRMHM.2018.05.015).
14. Ayi A.A., Anyama C.A., Khare V. On the synthesis of molybdenum nanoparticles under reducing conditions in ionic liquids. *Journal of Materials*, 2015, 1: 1-7 (doi: 10.1155/2015/372716).
15. Huber J.T., Price N.O., Engel R.W. Response of lactating dairy cows to high levels of dietary molybdenum. *Journal of Animal Science*, 1971, 32(2): 364-367 (doi: 10.2527/jas1971.322364x).
16. Blood D.C., Radostits O.M. *Veterinary Medicine*. 9th ed. ELBS, Bailliere and Tindall, London, 2000.
17. Yamane Y., Fukuchi M., Li C.K., Koizumi T. Protective effect of sodium molybdate against the acute toxicity of cadmium chloride. *Toxicology*, 1990, 60(3): 235-243 (doi: 10.1016/0300-483x(90)90146-8).

18. Godt J., Scheidig F., Grosse-Siestrup C., Esche V., Brandenburg P., Reich A., Groneberg D.A. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2006, 1: 22 (doi: 10.1186/1745-6673-1-22).
19. Healy J., Tipton K. Ceruloplasmin and what it might do. *Journal of Neural Transmission*, 2007, 114: 777-781 (doi: 10.1007/s00702-007-0687-7).
20. *Byulleten' normativnykh normativnykh i metodicheskikh dokumentov Gossanepidnadzora*, 2009, 4(38): 117-143 (in Russ.).
21. Duffin R., Tran L., Brown D., Stone V., Donaldson K. Proinflammogenic effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting, the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhalation Toxicology*, 2007, 19(10): 849-856 (doi: 10.1080/08958370701479323).
22. Alenzi F.Q., Lotfy M., Wyse R. Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2010, 11(2): 271-280.
23. Liu P.-F., Hu Y.-C., Kang B.-H., Tseng Y.-K., Wu P.-C., Liang C.-C., Hou Y.-Y., Fu T.-Y., Liou H.-H., Hsieh I.-C., Ger L.P., Shu C.-W. Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, 2017, 12(7): e0180620 (doi: 10.1371/journal.pone.0180620).
24. Sheida E.V., Rusakova E.A., Sizova E.A., Sipailova O.Yu., Kosyan D.B. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2019, 1(75): 140-143 (in Russ.).
25. Sherkhov Z.Kh., Sherkhov Kh.K., Sherkhova L.K. *Izvestiya Kabardino-Balkarskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2010, 5-2(37): 57-62 (in Russ.).
26. Batley G.E., Kirby J.K., McLaughlin M.J. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. *Accounts of Chemical Research*, 2013, 46(3): 854-862 (doi: 10.1021/ar2003368).
27. Shaw B.J., Handy R.D. Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nano-metals versus metal ions. *Environment International*, 2011, 37(6): 1083-1097 (doi: 10.1016/j.envint.2011.03.009).
28. Dmitrieva E.V., Moskaleva E.YU., Kogan E.A., Bueverov A.O., Belushkina N.P., Ivashkin V.T., Severin E.S., Pal'tsev M.A. *Arkhiv patologii*, 2003, 65(6): 13-17 (in Russ.).
29. Amara S., Khemissi W., Mrad I., Rihane N., Ben Slama I., El Mir L., Jeljeli M., Ben Rhouma K., Abdelmelek H., Sakly M. Effect of TiO₂ nanoparticles on emotional behavior and biochemical parameters in adult Wistar rats. *General Physiology and Biophysics*, 2013, 32(2): 229-234 (doi: 10.4149/gpb_2013015).
30. Sheida E., Sipailova O., Miroshnikov S., Sizova E., Lebedev S., Rusakova E., Notova S. The effect of iron nanoparticles on performance of cognitive tasks in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(9): 8700-8710 (doi: 10.1007/s11356-017-8531-6).
31. Sizova E.A., Miroshnikov S.A., Lebedev S.V., Levakhin Yu.I., Babicheva I.A., Kosilov V.I. Comparative tests of various sources of microelements in feeding chicken-broilers. *Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya]*, 2018, 53(2): 393-403 (doi: 10.15389/agrobiol-ogy.2018.2.393eng).