

## ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У КРЫС ЛИНИИ Wistar ПОД ВЛИЯНИЕМ МОЛИБДЕНСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ\*

Е.А. СИЗОВА<sup>1, 2</sup>, С.А. МИРОШНИКОВ<sup>1</sup>, В.В. КАЛАШНИКОВ<sup>3</sup>

Несмотря на широкое применение наночастиц Мо в различных отраслях промышленности и в медицине, информация о последствиях взаимодействия вновь создаваемых на их основе наноматериалов и биологических объектов ограничена. Анализ накопленных данных о молибденосодержащих наночастицах позволяет предположить наличие у них токсического действия. Нами впервые выполнено сравнительное исследование биологических эффектов наночастиц Мо и его оксида в отношении модельных теплокровных животных. Для этого мы изучили состояние метаболических процессов и обмен химических элементов у крыс линии Wistar под влиянием наночастиц молибдена (Мо НЧ) в дозе 1 и 25 мг/кг живой массы и его оксида (МоО<sub>3</sub> НЧ) в дозе 1,2 и 29 мг/кг живой массы при внутрибрюшинном введении. Морфологические показатели крови и гематокрит определяли с использованием автоматического гематологического анализатора, состояние антиоксидантной системы (активность каталазы, супероксиддисмутазы), а также функцию основных ферментов метаболизма (активность аланинаминотрансферазы — АлАТ, аспаратаминотрансферазы — АсАТ, лактатдегидрогеназы — ЛДГ,  $\gamma$ -глутамилтрансферазы — ГГТ, креатинкиназы) и ряд биохимических показателей (концентрация креатинина, билирубина, мочевины) — на автоматическом биохимическом анализаторе в динамике (на 1-е, 7-е и 14-е сут). Концентрацию микроэлементов определяли методами атомно-эмиссионной и масс-спектрометрии. При введении Мо НЧ и МоО<sub>3</sub> НЧ уже на 1-е сут содержание лейкоцитов снижалось на 11,3 % ( $P < 0,05$ ) и 58,5 % ( $P < 0,01$ ). Особенностью действия наночастиц оказалось уменьшение числа моноцитов в 1-е сут на 18,9 ( $P < 0,05$ ); 41,9 ( $P < 0,01$ ); 51,7 ( $P < 0,05$ ) и 83,3 % ( $P < 0,001$ ) в зависимости от вида и дозы наночастиц с сохранением достоверных различий с контролем только при введении МоО<sub>3</sub> НЧ в дозе 29 мг/кг (54,5 %,  $P < 0,05$ ). На 7-е и 14-е сут у крыс проявлялись признаки молибденовой интоксикации, сильнее выраженной для МоО<sub>3</sub> НЧ. При максимальных дозировках наночастиц число тромбоцитов увеличивалось к 14-м сут, что приводило к повышению вязкости крови и затруднению перфузии через микрососуды. Полученные результаты показали возрастание активности сывороточных аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ), а также ГГТ и ЛДГ, наличие признаков окислительного стресса, анемии, капиллярно-трофической недостаточности у животных, получавших высокие дозы молибдена и его оксида. Со временем наблюдаемые эффекты прогрессировали, наиболее заметно проявляясь в случае МоО<sub>3</sub> НЧ. Таким образом, Мо НЧ (при сопоставимости доз введения) менее токсичны, чем МоО<sub>3</sub> НЧ.

**Ключевые слова:** каталаза, супероксиддисмутаза,  $\gamma$ -глутамилтрансфераза, лактатдегидрогеназа, аминотрансферазы, наночастицы молибдена, наночастицы оксида молибдена.

Наноформы молибдена широко применяются в современных технологиях (1, 2), в том числе при многофункциональном электрокатализе (3), производстве смазочных материалов (4). Кроме того, ультрадисперсные препараты молибдена и его соединений обладают уникальными биологическими свойствами, что позволяет использовать их при терапии опухолей (5), в качестве противомикробных (6, 7) и противогрибковых средств (8), для стимулирования роста синезеленых водорослей (9).

Молибден как эссенциальный микроэлемент хорошо изучен. Известно об его участии в ферментативных системах (10). Описаны диапазоны дефицита, достаточности и токсичности молибдена (11). Известны фоновые (12), пороговые и токсические концентрации молибдена для беспозвоночных в почвах (13). Однако сведения о последствиях взаимодействия вновь создаваемых молибденосодержащих наноматериалов с биологически-

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-36-00023). Исследования проводились в лаборатории «Агроэкология техногенных наноматериалов» и Испытательном центре (ФГБНУ Всероссийский НИИ мясного скотоводства, аттестат аккредитации RA. RU.21ПФ59 от 02.12.15). Анализ образцов на содержание химических элементов проводили в лаборатории АНО «Центр биотической медицины», г. Москва (аттестат аккредитации ГСЭН.RU.ЦАО.311, Регистрационный номер в Государственном реестре РОСС RU. 0001.513118).

ми объектами все еще крайне ограничены. Между тем поисковые исследования свидетельствуют о том, что биологические эффекты наночастиц молибдена значительно более выражены. Это показано на различных моделях. В частности, поступление наночастиц оксида молибдена в почву приводит к высокой смертности, адаптационным изменениям активности антиоксидантных ферментов и депрессии обмена Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, Si, V у *Eisenia fetida* (14). Присутствие наночастиц молибдена в водной среде сопровождается нарушением проницаемости клеточной мембраны у *Stylomychia mytilus* и процессами, сопутствующими повреждению (15). Анализ накопленных данных о биологических эффектах молибденсодержащих наночастиц позволяет предположить наличие у них токсического действия в отношении теплокровных животных.

Мы впервые сравнили биологические эффекты наночастиц молибдена и его оксида в отношении теплокровных животных (крыс).

Цель работы заключалась в изучении морфологических и биохимических показателей крови, морфофункциональных характеристик тканей и обмена химических элементов у модельных объектов под влиянием наночастиц молибдена и его оксида.

**Методика.** Наночастицы (НЧ) молибдена (Мо НЧ) и оксида молибдена (МоО<sub>3</sub> НЧ) получали методом плазмохимического синтеза (ООО «Платина», г. Москва). Препараты Мо НЧ (d = 50 нм, удельная поверхность 14 м<sup>2</sup>/г, Z-потенциал  $-43 \pm 0,52$  мВ) содержали 99,7 % Мо и 0,3 % О<sub>2</sub>. МоО<sub>3</sub> НЧ (d = 92 нм, удельная поверхность 12 м<sup>2</sup>/г, Z-потенциал  $-43 \pm 0,21$  мВ) — 99,8 % Мо и 0,2 % О<sub>2</sub>. Материаловедческая аттестация препаратов (определение размера частиц, полидисперсности, объемности, содержания фракций, площади поверхности) включала электронную сканирующую, просвечивающую и атомно-силовую микроскопию с использованием LEX T OLS4100, JSM 7401F и JEM-2000FX («JEOL», Япония). Распределение частиц по размерам исследовали на анализаторе Photocor Comract (ООО «Фотокор», Россия). Препараты наночастиц диспергировали в физиологическом растворе с помощью УЗДН-2Т («НПП Академприбор», Россия) (35 кГц, 300 Вт, 10 мкА, 30 мин).

Исследования проводили на 75 белых крысах-самцах линии Wistar массой 150-180 г в стандартных условиях вивария (экспериментально-биологическая клиника, Оренбургский государственный университет). Рацион животных (ГОСТ Р 50258-92) соответствовал правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96). Эксперименты выполняли в соответствии с протоколами Женевской конвенции и принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009), а также согласно рекомендациям «The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D.C. 1996)». После подготовительного периода (1 мес) животных разделили на пять групп (в каждой n = 15). Однократно внутрибрюшинно животным в I и II группах вводили Мо НЧ в дозах соответственно 1 и 25 мг/кг живой массы, в III и IV группах — МоО<sub>3</sub> НЧ в дозах соответственно 1,2 и 29 мг/кг. Контрольным животным вводили физиологический раствор.

Биоматериал для исследования получали после декапитации крыс под нембуталовым наркозом (5 особей в каждом варианте опыта и в контроле через 1, 7 и 14 сут после введения нанопрепаратов). Кровь для определения морфологических показателей отбирали в вакуумные пробирки с добавлением антикоагулянта, для биохимических показателей — в вакуумные пробирки с активатором свертывания (тромбин). Морфологический

состав крови и количество гемоглобина определяли на автоматическом гематологическом анализаторе URIT-2900 Vet Plus («URIT Medical Electronic Group Co., Ltd», Китай). Биохимический анализ сыворотки крови выполняли на автоматическом анализаторе CS-T240 («DIRUI Industrial Co., Ltd», Китай) с коммерческими наборами для ветеринарии (ДиаВетТест, ЗАО «ДИАКОН-ДС», Россия; «Randox Laboratories Ltd», Великобритания). Содержание химических элементов в исследуемых образцах определяли на масс-спектрометре Elan 9000 и атомно-эмиссионном спектрометре Optima 2000V («Perkin Elmer», США). Для озоления использовали микроволновую систему разложения Multiwave 3000 («Anton Paar», Австрия).

При изучении микроструктуры печени образцы фиксировали в 10 % нейтральном формалине и заливали в парафиновую смесь HISTOMIX® (ОО «БиоВитрум», Россия). Гистологические срезы толщиной 5-6 мкм готовили на полуавтоматическом микротоме (МЗП 01, «Техном», Россия), окрашивали гематоксилином Майера и эозином и просматривали под световым микроскопом МТ 5300L («Meiji Techno Co., Ltd», Япония,  $\times 400$ ).

Данные представлены как среднее ( $M$ ) и стандартная ошибка среднего ( $m$ ). Статистический анализ выполняли с использованием методов ANOVA (программный пакет Statistica 10.0, «StatSoft Inc.», США) и Microsoft Excel. Достоверность различий сравниваемых показателей определяли по  $t$ -критерию Стьюдента. Достоверными считали значения при  $P < 0,05$ .

**Результаты.** При введении наночастиц молибдена и его оксида уже на 1-е сут эксперимента отмечали достоверные морфологические изменения крови (табл. 1). Так, содержание лейкоцитов во II и IV группах снижалось на 11,3 % ( $P < 0,05$ ) и 58,5 % ( $P < 0,01$ ).

**1. Динамика морфологических показателей крови у крыс линии Wistar после внутрибрюшинного введения наночасти (НЧ) Мо и МоО<sub>3</sub> в разных дозировках ( $M \pm m$ ,  $n = 75$ )**

| Показатель                      | Контроль           | Мо НЧ               |                     | МоО <sub>3</sub> НЧ |                    |
|---------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
|                                 |                    | I группа            | II группа           | III группа          | IV группа          |
| В 1-е сут                       |                    |                     |                     |                     |                    |
| Лейкоциты, $\times 10^9$ /л     | 8,80 $\pm$ 0,180   | 8,85 $\pm$ 0,095    | 7,90 $\pm$ 0,080    | 7,25 $\pm$ 0,550    | 6,55 $\pm$ 0,150   |
| Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л | 8,59 $\pm$ 0,120   | 8,90 $\pm$ 0,155    | 8,65 $\pm$ 0,155    | 9,50 $\pm$ 0,380    | 8,52 $\pm$ 0,165   |
| Гемоглобин, г/л                 | 172,5 $\pm$ 1,50   | 189,5 $\pm$ 5,50    | 162,5 $\pm$ 4,50    | 184,0 $\pm$ 6,00    | 133,5 $\pm$ 1,50   |
| Тромбоциты, $\times 10^9$ /л    | 170,50 $\pm$ 9,500 | 176,00 $\pm$ 12,000 | 250,00 $\pm$ 5,130* | 188,50 $\pm$ 6,500  | 184,50 $\pm$ 6,500 |
| Лимфоциты, $\times 10^9$ /л     | 4,10 $\pm$ 0,010   | 3,75 $\pm$ 0,015    | 4,35 $\pm$ 0,015    | 2,90 $\pm$ 0,030    | 2,30 $\pm$ 0,090   |
| Моноциты, $\times 10^9$ /л      | 2,20 $\pm$ 0,090   | 1,85 $\pm$ 0,050*   | 1,55 $\pm$ 0,035*   | 1,45 $\pm$ 0,035**  | 1,20 $\pm$ 0,070** |
| Гранулоциты, $\times 10^9$ /л   | 2,50 $\pm$ 0,090   | 3,25 $\pm$ 0,015*   | 2,00 $\pm$ 0,050    | 2,90 $\pm$ 0,090*   | 2,05 $\pm$ 0,055   |
| На 7-е сут                      |                    |                     |                     |                     |                    |
| Лейкоциты, $\times 10^9$ /л     | 7,10 $\pm$ 0,120   | 6,50 $\pm$ 0,160    | 7,85 $\pm$ 0,195    | 6,60 $\pm$ 0,110    | 7,95 $\pm$ 0,450   |
| Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л | 8,12 $\pm$ 0,430   | 7,60 $\pm$ 0,360    | 7,43 $\pm$ 0,110    | 6,62 $\pm$ 0,230    | 7,55 $\pm$ 0,050   |
| Гемоглобин, г/л                 | 165,0 $\pm$ 10,20  | 156,0 $\pm$ 6,00    | 143,0 $\pm$ 3,00    | 126,0 $\pm$ 5,0     | 145,0 $\pm$ 8,0    |
| Тромбоциты, $\times 10^9$ /л    | 159,5 $\pm$ 3,50   | 162,0 $\pm$ 8,00    | 182,5 $\pm$ 2,50*   | 183,0 $\pm$ 8,00    | 179,5 $\pm$ 7,50   |
| Лимфоциты, $\times 10^9$ /л     | 3,80 $\pm$ 0,01    | 3,50 $\pm$ 0,07     | 3,70 $\pm$ 0,09     | 2,90 $\pm$ 0,01*    | 3,40 $\pm$ 0,07    |
| Моноциты, $\times 10^9$ /л      | 2,10 $\pm$ 0,210   | 2,35 $\pm$ 0,150    | 2,65 $\pm$ 0,300    | 1,95 $\pm$ 0,020    | 1,40 $\pm$ 0,060*  |
| Гранулоциты, $10^9$ /л          | 2,50 $\pm$ 0,090   | 1,65 $\pm$ 0,035    | 2,50 $\pm$ 0,070    | 2,75 $\pm$ 0,085    | 3,15 $\pm$ 0,015*  |
| На 14-е сут                     |                    |                     |                     |                     |                    |
| Лейкоциты, $\times 10^9$ /л     | 8,15 $\pm$ 0,350   | 8,95 $\pm$ 0,150    | 8,75 $\pm$ 0,150    | 6,26 $\pm$ 0,043    | 7,95 $\pm$ 0,250   |
| Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л | 8,78 $\pm$ 0,430   | 8,62 $\pm$ 0,165    | 6,86 $\pm$ 0,105    | 5,91 $\pm$ 0,139    | 6,76 $\pm$ 0,160   |
| Гемоглобин, г/л                 | 166,5 $\pm$ 9,50   | 157,5 $\pm$ 5,50    | 122,5 $\pm$ 5,50    | 108,8 $\pm$ 5,25    | 128,0 $\pm$ 8,00   |
| Тромбоциты, $\times 10^9$ /л    | 188,5 $\pm$ 7,50   | 154,5 $\pm$ 3,50    | 352,0 $\pm$ 6,00**  | 149,88 $\pm$ 5,13   | 311,5 $\pm$ 9,50** |
| Лимфоциты, $\times 10^9$ /л     | 4,50 $\pm$ 0,012   | 3,05 $\pm$ 0,015    | 2,20 $\pm$ 0,020    | 2,10 $\pm$ 0,099    | 2,75 $\pm$ 0,035   |
| Моноциты, $\times 10^9$ /л      | 2,55 $\pm$ 0,015   | 2,05 $\pm$ 0,015    | 2,10 $\pm$ 0,012    | 2,42 $\pm$ 0,038    | 1,65 $\pm$ 0,015*  |
| Гранулоциты, $\times 10^9$ /л   | 2,10 $\pm$ 0,020   | 3,85 $\pm$ 0,025    | 4,45 $\pm$ 0,035    | 4,74 $\pm$ 0,066    | 3,55 $\pm$ 0,045   |

Примечание. I и II группы — дозы соответственно 1 и 25 мг/кг живой массы, III и IV группы — 1,2 и 29 мг/кг.

\*, \*\* Различия с контролем статистически значимы соответственно при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ .

Особенностью действия содержащих молибден наночастиц оказалось уменьшение числа моноцитов в 1-е сут на 18,9 ( $P < 0,05$ ); 41,9 ( $P < 0,01$ ); 51,7 ( $P < 0,05$ ) и 83,3 % ( $P < 0,001$ ) соответственно в I, II, III и IV груп-

пах. Через 7 сут эта разница составила 55,6 ( $P < 0,05$ ); 27,3 ( $P < 0,05$ ); 7,7 и 50,0 % ( $P < 0,05$ ). К завершению эксперимента достоверные различия сохранились только между контрольной и IV группами (54,5 %,  $P < 0,05$ ). Обнаруженные нами эффекты наночастиц в отношении моноцитов кардинально отличались от описанных для наночастиц полистирола (16) и наночастиц меди и железа (17). Аналогичная динамика была характерна для лимфоцитов, число которых в крови животных из IV группы снизилось в 1-е сут на 78,6 % ( $P < 0,001$ ), на 14-е — на 63,6 % ( $P < 0,001$ ). В остальных группах достоверное снижение содержания лимфоцитов происходило только на 14-е сут. О сходной динамике числа лимфоцитов у человека при ингаляционном поступлении оксида молибдена сообщалось ранее (18).

На 7-е и 14-е сут после введения наночастиц у крыс проявлялись признаки молибденовой интоксикации (снижение содержания эритроцитов и гемоглобина), сильнее выраженной для  $\text{MoO}_3$  НЧ, что обусловлено более высокой токсичностью оксида по сравнению с металлом (19).

В группах, получавших наибольшие дозировки наночастиц молибдена и его оксида, к 14-м сут число тромбоцитов увеличивалось, что приводило к сгущиванию крови, повышению вязкости и затруднению перфузии через микрососуды. Сходные проявления описаны ранее для молибденсодержащих наночастиц (20, 21).

## 2. Динамика биохимических показателей крови у крыс линии Wistar после внутрибрюшинного введения наночастиц (НЧ) $\text{Mo}$ и $\text{MoO}_3$ в разных дозировках ( $M \pm m$ , $n = 75$ )

| Показатель  | Контроль      | Mo НЧ          |                | MoO <sub>3</sub> НЧ |                |
|---|---------------|----------------|----------------|---------------------|----------------|
|   |               | I группа       | II группа      | III группа          | IV группа      |
| В 1-е сут   |               |                |                |                     |                |
| АлАТ, Е/л   | 59,75±5,890   | 97,00±7,000    | 70,65±3,750    | 80,12±2,720         | 44,35±1,550*   |
| АсАТ, Е/л   | 140,50±2,200  | 434,80±16,500* | 452,95±14,950* | 376,50±16,600       | 218,00±17,120  |
| ЛДГ, Е/л  | 279,00±12,200 | 232,00±15,700  | 272,50±10,150  | 250,00±13,000       | 324,50±14,500  |
| ГГТ, Е/л  | 1,40±0,014    | 7,00±0,030*    | 1,00±0,010     | 15,00±0,120*        | 3,00±0,150     |
| Каталаза, мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ | 2668±104      | 10983±418      | 6550±148*      | 8225±295            | 5664±231       |
| СОД, %  | 110,0±5,12    | 130,0±8,01     | 128,0±7,81     | 140,0±2,13*         | 140,0±3,11*    |
| Креатинин, мкмоль/л   | 48,50±1,200   | 42,45±1,450    | 49,95±2,850    | 44,95±0,850         | 75,60±1,700**  |
| Билирубин, мкмоль/л   | 5,31±0,025    | 5,13±0,031     | 5,25±0,018     | 25,80±0,640**       | 19,70±0,920*   |
| Мочевина, ммоль/л   | 5,35±0,051    | 4,25±0,053     | 6,30±0,050     | 4,40±0,070          | 7,00±0,080**   |
| Креатинкиназа, Е/л  | 2948±220      | 3556±134       | 5227±107       | 2693±114            | 2902±172       |
| На 7-е сут  |               |                |                |                     |                |
| АлАТ, Е/л   | 67,25±3,450   | 128,85±17,350  | 147,60±6,800   | 111,50±4,800        | 132,20±3,100   |
| АсАТ, Е/л   | 148,35±7,450  | 567,60±19,100  | 664,95±11,950  | 531,20±25,700       | 699,25±13,550  |
| ЛДГ, Е/л  | 305,50±9,500  | 374,50±9,500   | 309,00±11,000  | 305,00±14,000       | 433,00±15,800  |
| ГГТ, Е/л  | 1,50±0,050    | 1,50±0,050     | 5,00±0,025     | 2,00±0,100          | 4,50±0,050     |
| Каталаза, мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ | 2413±131      | 3792±147       | 7486±248       | 8865±212            | 22029±931**    |
| СОД, %  | 136,8±16,20   | 666,2±6,80**   | 470,4±14,90    | 367,0±12,00         | 396,8±3,00*    |
| Креатинин, мкмоль/л   | 47,75±0,650   | 58,20±1,100    | 32,15±1,250    | 44,20±3,500         | 42,65±3,150    |
| Билирубин, мкмоль/л   | 5,96±0,042    | 5,86±0,028     | 5,49±0,067     | 8,05±0,040          | 6,90±0,097     |
| Мочевина, ммоль/л   | 5,70±0,012    | 4,15±0,050     | 5,00±0,100     | 5,80±0,150          | 5,55±0,170     |
| Креатинкиназа, Е/л  | 2726±110      | 5429±298       | 4394±115       | 4278±283            | 4178±148       |
| На 14-е сут   |               |                |                |                     |                |
| АлАТ, Е/л   | 65,80±4,900   | 182,50±8,900   | 242,25±9,750   | 142,00±8,300        | 128,60±7,600   |
| АсАТ, Е/л   | 142,05±11,150 | 459,70±28,800  | 629,25±37,850* | 147,00±4,280        | 367,55±15,850* |
| ЛДГ, Е/л  | 243,00±12,000 | 236,00±14,000  | 294,50±8,500   | 177,88±5,120        | 291,50±8,500*  |
| ГГТ, Е/л  | 1,50±0,050    | 12,50±0,500    | 8,50±0,120     | 1,58±0,042          | 5,50±0,050     |
| Каталаза, мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ | 2532±151      | 4122±195       | 6846±285       | 8764±256*           | 20021±725*     |
| СОД, %  | 130,2±8,84    | 146,5±12,93    | 108,1±5,82     | 94,0±5,05           | 166,3±2,09*    |
| Креатинин, мкмоль/л   | 42,60±0,140   | 48,30±0,240    | 51,40±0,200*   | 46,07±0,535         | 77,75±0,650**  |
| Билирубин, мкмоль/л   | 5,64±0,425    | 5,25±0,545     | 12,02±0,615    | 2,40±0,171          | 4,58±0,125     |
| Мочевина, ммоль/л   | 5,60±0,016    | 5,50±0,030     | 6,00±0,017     | 4,21±0,099          | 10,60±0,080*   |
| Креатинкиназа, Е/л  | 2670±68       | 4090±175       | 3148±103       | 3225±118            | 3971±163       |

Примечание. I и II группы — дозы соответственно 1 и 25 мг/кг, III и IV группы — 1,2 и 29 мг/кг живой массы. АлАТ, АсАТ, ЛДГ, ГГТ, СОД — аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа,  $\gamma$ -глутамилтрансфераза, супероксиддисмутатаза.

\*, \*\* Различия с контролем статистически значимы соответственно при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ .

Таким образом, признаки анемии, лейкопении, сладж-феномен, местные воспалительные реакции отражают наступление капиллярно-трофической недостаточности при применении  $\text{MoO}_3$  НЧ. Поскольку использованные дозы наночастиц молибдена и его оксида сопоставимы, можно сделать вывод, что первые менее токсичны.

Рост активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаргатаминотрансферазы (АсАТ) у животных свидетельствовал о наличии цитолиза, причем со временем этот процесс усугублялся (табл. 2). Так, по АлАТ и количеству общего билирубина при разнице с контролем в 1-е сут в пределах 18,2-62,0 % на 7-е сут она составила до 119,0 %, на 14-е сут — 272,0 %. В случае АсАТ различия оказались еще заметнее — 222,0-352,0 %; в случае билирубина достоверное увеличение (в 4,8 раза) отмечали уже в 1-е сут для  $\text{MoO}_3$  НЧ. При максимальной дозировке  $\text{MoO}_3$  НЧ (29 мг/кг) в 1-е сут регистрировали достоверное ( $P < 0,05$ ) снижение активности АлАТ. Это может быть косвенным признаком нарушения клубочковой фильтрации, что подтверждают высокие показатели по креатинину (разница с контролем в 14,3 раза,  $P < 0,01$ ) и мочеvine (выше на 30,8 %,  $P < 0,01$ ).

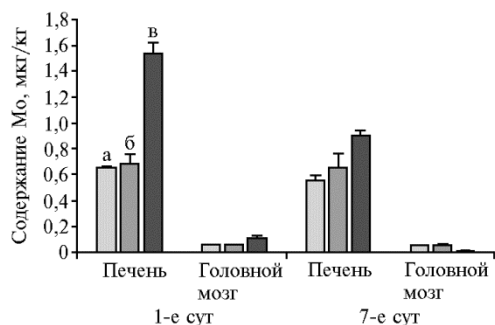
Мы не обнаружили повышения активности сывороточной  $\gamma$ -глутамилтрансферазы (ГГТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Показатели, близкие к верхним границам нормы, были зафиксированы в 1-е сут для минимальных дозировок  $\text{Mo}$  НЧ и  $\text{MoO}_3$  НЧ, а также на 7-е и 14-е сут при максимальных дозах обеих наночастиц. Такая динамика активности ГГТ и ЛДГ может свидетельствовать о разрушении мембран незначительной популяции клеток и слабой индукции микросомального окисления под влиянием наночастиц металлов переменной валентности (22). В то же время с увеличением сроков воздействия до 14 сут при минимальной дозе  $\text{Mo}$  НЧ активность ГГТ повышалась 5-кратно, что может оцениваться как признак окислительного стресса, который способны индуцировать  $\text{Mo}$  НЧ. Ранее подобное описано на фибробластах мышей (линия L929) при генерации активных форм кислорода на фоне снижения количества глутатиона и активности каталазы (23). Активность ЛДГ возрастала только при высоких дозах агента (преимущественно  $\text{MoO}_3$  НЧ), которые можно отнести к умеренно токсичным по сравнению с другими металлами переменной валентности (24).

На проявление окислительного стресса указывала и динамика активности каталазы (КТ) и супероксиддисмутазы (СОД). Пики показателей для КТ регистрировали при высокой дозе  $\text{MoO}_3$  НЧ (29 мг/кг) на 7-е и 14-е сут при разнице с контролем соответственно в 9,0 раза ( $P < 0,01$ ) и в 7,9 раза ( $P < 0,05$ ). Минимальные дозировки в 1-е сут вызывали всплеск активности КТ (разница с контролем в 4,1 раза), к 7-м сут показатели снижались до 1,5-кратной разницы, а к 14-м сут возрастали, но не достигали исходного уровня. По-видимому, в ответ на усиление перекисного окисления липидов и накопления пероксида водорода и других продуктов окислительного стресса активизируется каталаза, которая их метаболизирует и предотвращает накопление в клетках. Однако некоторые авторы считают, что  $\text{Mo}$  НЧ нетоксичны и способны выступать в качестве антиоксидантов, например проявляя протективный эффект при контакте с перекисными соединениям ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и  $\text{ZnO-NPS}$ , что показано для линий клеток аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7) и фибросаркомы (HT-1080). Установлено, что  $\text{Mo}$  НЧ значительно повышали количество глутатиона в линии MCF-7 (в 1,6 раза) и HT-1080 (в 1,3 раза), что сравнимо с эффектом антиоксидантного препарата N-ацетил-цистеина (NAC) (25).

В печени тоже проявились как минимальные микроструктурные из-

менения (зернистая дистрофия, гипертрофия гепатоцитов и гиперхромия их ядер) в случае низких доз Мо НЧ и МоО<sub>3</sub> НЧ, так и значительные патологические сдвиги (обширные участки гепатоза и очаги некроза) при высоких дозах МоО<sub>3</sub> НЧ.

Одним из факторов воздействия наночастиц молибдена на животных могли стать антагонистические взаимодействия молибдена с другими микроэлементами (26). Анализ состава печени, мышечных тканей и головного мозга животных на содержание 25 химических элементов выявил достоверные изменения по трем — Мо, Fe и Са. Так, в печени в I и II группах по Fe отмечали снижение показателя соответственно на 31,1 (P < 0,01) и 38,9 % (P < 0,001) в 1-е сут и на 24,0 (P < 0,01) и 76,1 % (P < 0,001) — на 7-е сут. Для тканей головного мозга разница составила 48,3 (P < 0,001), 90,1 (P < 0,001) и 21,1 (P < 0,01), 41,5 % (P < 0,001). Использование МоО<sub>3</sub> НЧ сопровождалось сходными изменениями. По Са наблюдали достоверный рост накопления в печени только в 1-е сут — на 17,1 % (P < 0,05) в I группе и на 26,3 % (P < 0,01) во II группе. Анализ содержания Мо показал такую же динамику (рис.). Пик значений приходился на 1-е сут и прямо зависел от дозы введения Мо с манифестной разницей (136,9 %) для печени. За следующие 7 сут количество Мо в печени снижалось у животных из II группы на 41,55 %, I — на 4,41 % относительно показателя в 1-е сут.



**Динамика накопления молибдена в органах крыс линии Wistar после однократного введения наночастиц Мо в разных дозировках: а — контроль, б — 1 мг/кг, в — 25 мг/кг.**

В головном мозге накопление при дозе 1 мг/кг было сопоставимо с таковым у интактных животных. Увеличение дозы до 25 мг/кг приводит к росту содержания Мо на 83,3 % в 1-е сут и его уменьшению на 7-е сут до значений ниже контрольных.

Полученные результаты в целом закономерны. Известно, что молибден — один из эссенциальных микроэлементов и его недостаток сопровождается развитием ряда патологий у человека и животных (27). Между тем в литературе описано и токсическое действие молибдена на организм, тесная связь гиперэлементоза по молибдену и развитием астмы (28), развитием альвеолярных и бронхиальных аденом и карцином (29) и пр.

Таким образом, введение наночастиц Мо крысам сопровождается капиллярно-трофической недостаточностью, признаками окислительного стресса (с более явным проявлением в случае наночастиц оксида молибдена). Учитывая сопоставимые дозы агентов, можно считать наночастицы молибдена менее токсичными, чем наночастицы его оксида.

## ЛИТЕРАТУРА

- Chen Y.X., Wu C.W., Kuo T.Y., Chang Y.L., Jen M.H., Chen I.W. Large-scale production of large-size atomically thin semiconducting molybdenum dichalcogenide sheets in water and its application for supercapacitor. *Sci. Rep.*, 2016, 26(6): 26660 (doi: 10.1038/srep26660).
- Naylor C.H., Kybert N.J., Schneier C., Xi J., Romero G., Saven J.G., Liu R., Johnson A.T. Scalable production of molybdenum disulfide based biosensors. *ACS Nano*, 2016, 10(6): 6173–6179 (doi: 10.1021/acsnano.6b02137).
- Tadi K.K., Palve A.M., Pal S., Sudeep P.M., Narayanan T.N. Single step, bulk synthesis of engineered MoS<sub>2</sub> quantum dots for multifunctional electrocatalysis. *Nanotechnology*, 2016, 27(27): 275402 (doi: 10.1088/0957-4484/27/27/275402).
- Паренаго О.П., Бакунин В.Н., Кузьмина Г.Н., Суслов А.Л., Веденеев

- ва Л.М. Наночастицы сульфидов молибдена — новый класс добавок к углеводородным смазочным материалам. ДАН, 2002, 383(1): 84-86.
5. Liu Q., Sun C., He Q., Liu D., Khalil A., Xiang T., Wu Z., Wang J., Song L. Ultrathin carbon layer coated MoO<sub>2</sub> nanoparticles for high-performance near-infrared photothermal cancer therapy. Chem. Commun. (Camb.), 2015, 51(49): 10054-10057 (doi: 10.1039/c5cc02016f).
  6. 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).
  7. 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).
  8. Qureshi N., Chaudhari R., Mane P., Shinde M., Jadakar S., Rane S., Kale B., Bhalerao A., Amalnerkar D. Nanoscale Mo-MoO<sub>3</sub> entrapped in engineering thermoplastic: inorganic pathway to bactericidal and fungicidal action. IEEE Transactions on NanoBioscience, 2016, 15(3): 258-264 (doi: 10.1109/TNB.2016.2535285).
  9. Sam J.S., Yuvakkumar R., Suriya P.R., Karunakaran G., Rajendran V., Hong S.I. Facile and novel synthetic method to prepare nano molybdenum and its catalytic activity. IET Nanobiotechnology, 2015, 9(4): 201-208 (doi: 10.1049/iet-nbt.2014.0015).
  10. Mendel R.R., Bittner F. Cell biology of molybdenum. BBA, 2006, 1763: 621-635 (doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.03.013).
  11. McBride M.B., Richards B.K., Steenhuis T., Spiers G. Molybdenum uptake by forage crops grown on sewage sludge-amended soils in the field and greenhouse. J. Environ. Qual., 2000, 29: 848-854.
  12. He Z.L.L., Yang X.E., Stoffella P.J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. J. Trace Elem. Med. Bio., 2005, 19: 125-140 (doi: 10.1016/j.jtemb.2005.02.010).
  13. Van Gestel C.A.M., Borgman E., Verweij R.A., Diez-Ortiz M. The influence of soil properties on the toxicity of molybdenum to three species of soil invertebrates. Ecotox. Environ. Safe., 2011, 74: 1-9 (doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.10.001).
  14. Lebedev S., Yausheva E., Galaktionova L., Sizova E. Impact of molybdenum nanoparticles on survival, activity of enzymes, and chemical elements in *Eisenia fetida* using test on artificial substrata. Environ. Sci. Pollut. Res. Int., 2016, 23(18): 18099-18110.
  15. Kosyan D., Rusakova E., Sizova E., Miroshnikov S., Skalniy A. Impact of nanoparticles of heavy metals and their oxides on *Styloynchia mytilus*. Ecology, Environment and Conservation, 2015, 21: 113-119.
  16. Fernández-Urrusuno R., Fattal E., Rodrigues J.M., Féger J., Bedossa P., Couvreur P. Effect of polymeric nanoparticle administration on the clearance activity of the mononuclear phagocyte system in mice. J. Biomed. Mater. Res., 1996, 31(3): 401-408.
  17. Яшueva Е.В., Мирошников С.А., Кван О.В. Оценка влияния наночастиц металлов на морфологические показатели периферической крови животных. Вестник Оренбургского государственного университета, 2013, 12(161): 203-207.
  18. Ott H.C., Prior C., Herold M., Riha M., Laufer G., Ott G. Respiratory symptoms and bronchoalveolar lavage abnormalities in molybdenum exposed workers. Wien Klin Wochenschr., 2004, 116(1): 25-30.
  19. Хантурина Г.Р., Ибраева Л.К., Лебедева Е.А. Биохимический анализ крови крыс при хроническом отравлении солями молибдена и хрома. Успехи современного естествознания, 2012, 12: 11-13.
  20. Остроушко А.А., Данилова И.Г., Медведева С.Ю., Гетте И.Ф., Тонкушина М.О. Изучение безопасности молибденовых нанокластерных полиоксометаллатов, предназначенных для адресной доставки лекарственных веществ. Уральский медицинский журнал, 2010, 9(74): 114-117.
  21. Остроушко А.А., Гетте И.Ф., Данилова И.Г., Медведева С.Ю., Тонкушина М.О., Прокофьева А.В. Исследование хронической токсичности молибденовых и железо-молибденовых нанокластерных полиоксометаллатов. Уральский медицинский журнал, 2011, 11(89): 75-79.
  22. Asadi F., Mohseni M., Dadashi Noshahr K., Soleymani F.H., Jalilvand A., Heidari A. Effect of Molybdenum nanoparticles on blood cells, liver enzymes, and sexual hormones in male rats. Biol. Trace Elem. Res., 2016: 1-7 (doi: 10.1007/s12011-016-0765-5).
  23. Siddiqui M.A., Saquib Q., Ahamed M., Farshori N.N., Ahmad J., Wahab R., Khan S.T., Alhadlaq H.A., Musarrat J., Al-Khedhairi A.A., Pant A.B. Molybdenum nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress, G<sub>2</sub>/M arrest, and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015, 1(125): 73-81 (doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.11.014).
  24. 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. Toxicol. in Vitro, 2005, 19(7): 975-983 (doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.034).
  25. Akhtar M.J., Ahamed M., Alhadlaq H.A., Alshamsan A., Khan M.A., Al-

- rokayan S.A. Antioxidative and cytoprotective response elicited by molybdenum nanoparticles in human cells. *J. Colloid Interf. Sci.*, 2015, 457: 370-377 (doi: 10.1016/j.jcis.2015.07.034).
26. Zhou S., Zhang C., Xiao Q., Zhuang Y., Gu X., Yang F., Xing C., Hu G., Cao H. Effects of different levels of molybdenum on rumen microbiota and trace elements changes in tissues from goats. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2016, 174(1): 1-8 (doi: 10.1007/s12011-016-0706-3).
  27. Bourke C.A. Molybdenum deficiency produces motor nervous effects that are consistent with amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Neurol.*, 2016, 7: 28 (doi: 10.3389/fneur.2016.00028).
  28. Huang X., Xie J., Cui X., Zhou Y., Wu X., Lu W., Shen Y., Yuan J., Chen W. Association between concentrations of metals in urine and adult asthma: a case-control study in Wuhan, China. *PLoS ONE*, 2016, 11(5): e0155818 (doi: 10.1371/journal.pone.0155818).
  29. Chan P.C., Herbert R.A., Roycroft J.H., Hasegan J.K., Grumbein S.L., Miller R.A.I. Lung tumor induction by inhalation exposure to molybdenum trioxide in rats and mice. *Toxicol. Sci.*, 1998, 45(1): 58-65.

<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ мясного скотоводства,  
460000 Россия, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29,  
e-mail: sizova-178@ya.ru, vniims.or@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Оренбургский государственный университет,  
460018 Россия, г. Оренбург, просп. Победы, 13;

<sup>3</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ коневодства,  
391105 Россия, Рязанская обл., Рыбновский р-н, пос. Дивово

Попутила в редакцию  
11 июля 2016 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, V. 51, № 6, pp. 929-936

## MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN Wistar RATS INFLUENCED BY MOLYBDENUM AND ITS OXIDE NANOPARTICLES

*E.A. Sizova<sup>1, 2</sup>, S.A. Miroshnikov<sup>1</sup>, V.V. Kalashnikov<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Beef Cattle Breeding, Federal Agency of Scientific Organizations, 29, ul. 9 Yanvarya, Orenburg, 460000 Russia, e-mail sizova-178@ya.ru, vniims.or@mail.ru;

<sup>2</sup>Orenburg State University, 13, prosp. Pobedy, Orenburg, 460018 Russia;

<sup>3</sup>All-Russian Research Institute of Horse Breeding, Federal Agency of Scientific Organizations, pos. Divovo, Rybnovskii Region, Ryazan Province, 391105 Russia

(ORCID: Sizova E.A. orcid.org/0000-0002-5125-5981)

Acknowledgements:

Studies were performed using standard techniques in the Laboratory of Agroecology of Nanomaterials and Test Center of All-Russian Research Institute of Beef Cattle Breeding (accreditation certificate RA. RU.21PF59 from 12/02/15). Analysis of chemical elements was performed in the laboratory of ANO Center for Biotic Medicine, Moscow (accreditation certificate GSEN.RU.TSAO.311, registration number in the State Register ROSS RU. 0001.513118)

Supported by Russian Science Foundation (project № 14-36-00023)

Received July 11, 2016

doi: 10.15389/agrobiologia.2016.6.929eng

### Abstract

Despite widespread use of nanoparticles in industry and medicine, there is very little information about how the newly developed nanomaterials interact with biological objects. Certain properties of the Mo-containing nanoparticles (NPs) suggest their possible toxic effect on warm-blooded animals. In this paper we compared the effect of Mo NPs (at 1 and 25 mg/kg) and its oxide MoO<sub>3</sub> NPs (at 1.2 and 29 mg/kg), when administrated parenterally, on metabolic parameters and the exchange of chemical elements in Wistar laboratory rats. There, we assessed the red and white blood cell counts, the hemoglobin level, the activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) (for oxidative status), the ALT, AST, LDH, GGT, creatine kinase activity, blood creatinine, bilirubin and urea concentrations (for metabolic status) at days 1, 7 and 14. A day after Mo NPs and MoO<sub>3</sub> NPs administration the number of blood leukocyte lowered by 11.3 % (P < 0.05) and 58.5 % (P < 0.01), respectively. Also, a decrease in monocyte number by 18.9 (P < 0.05), 41.9 (P < 0.01), 51.7 (P < 0.05) and 83.3 % (P < 0.001) as depending on NPs chemical composition and doses was characteristic, though on day 14 a significant difference to control (54.5 %, P < 0.05) was found only for MoO<sub>3</sub> NPs at a dose of 29 mg/kg. The number of thrombocytes was the highest on day 14 for the maximum dosage of both NPs leading to hindered blood microcirculation. The experiments also showed an increase in serum aminotransferases, GGT and LDH activity. In sum, we observed manifestations of oxidative stress, anemia and capillary-trophic insufficiency in the animals administrated with high doses of molybdenum and Mo oxide NPs. These signs were progressing and the most apparent for molybdenum oxide NPs. Given the comparable doses used, the molybdenum nanoparticles exhibit lower toxicity as compared to its oxide.

Keywords: catalase, superoxide dismutase, glutamyl transferase, lactate dehydrogenase, aminotransferase, nanoparticles of molybdenum, nanoparticles of molybdenum trioxide.