

РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В РЕАЛІЗАЦІЇ ТОКСИЧНОГО ЕФЕКТУ
КАРБОНОВИХ НАНОЧАСТИНОК

Вивчено вплив внутрішньочеревного введення карбонових наночастинок на генерацію вільних радикалів кисню та функціонування антиоксидантної системи в організмі експериментальних тварин. Показано, що під впливом одно- і багатостінкових нанотрубок активуються ліпопероксидні процеси в сироватці крові, а вміст антиоксиданта відновленого глутатіону знижується. Фулерени не впливали достовірно на параметри інтенсивності оксидативного стресу. Зроблено висновок, що оксидативний стрес є одним із механізмів токсичності карбонових нанотрубок при їх потраплянні в кров.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: оксидативний стрес, карбонові наночастинок, процеси ліпопероксидації, антиоксидантна система.

ВСТУП. У зв'язку з розвитком технологій одержання та використання наноматеріалів, які завдяки особливим хімічним, біологічним, фармакологічним та механічним властивостям здатні чинити непрогнозований вплив на біологічні об'єкти, нагально постає проблема оцінки ризику впливу наноречовин на організм людини і навколишнє середовище при їх виробництві та застосуванні [3]. Токсичність карбонових наночастинок було оцінено на різних типах клітин та живих організмів, і отримані результати в багатьох випадках були суперечливі – від повного заперечення будь-якого негативного їх впливу на живі об'єкти до висновків, що карбонові наночастинок за певних умов є високоцитотоксичними [6, 11, 12]. На сьогодні вирішення проблеми з'ясування, які атрибути карбонових наночастинок визначають їх токсичні ефекти, а також питання ідентифікації механізмів, що лежать в основі їх токсичності, мають життєво важливе значення [2].

Метою даної роботи було вивчити вплив внутрішньочеревного введення карбонових наночастинок на генерацію вільних радикалів кисню та функціонування антиоксидантної системи в сироватці крові експериментальних тварин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконано на білих безпородних щурах-самцях масою 150 г, яких утримували на стандартному раціоні

© С. О. Ястремська, Л. М. Палиця, І. М. Ястремська, В. М. Коробчук, М. М. Корда, 2014.

віварію. Одностінкові (ОСНТ), багатостінкові (БСНТ) нанотрубки і фулерени C_{60} вводили тваринам у вигляді суспензії (0,5 мл) внутрішньочеревно у дозі 60 мг/кг. За даними Z. Chen і співавт. [4], така доза карбонових наночастинок характеризується підгострою токсичністю. Контрольній групі щурів вводили внутрішньочеревно 0,5 мл ізотонічного розчину. Кров забирали з хвостової вени тварин через 3, 6 і 24 год із моменту введення наночастинок. Сироватку крові отримували шляхом центрифугування. Усі експерименти на щурах проводили згідно з Правилами використання лабораторних експериментальних тварин.

Малоновий діальдегід (МДА) визначали за методикою Л. І. Андреевої та співавт. [1]. При високій температурі в кислому середовищі МДА реагує з тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений комплекс червоного кольору з максимумом поглинання при 532 нм. Концентрацію відновленого глутатіону розраховували згідно з методикою, принцип якої полягає в тому, що при взаємодії 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної) кислоти (реактив Елмана) з вільними SH-групами відновленого глутатіону утворюється тіонітрофенільний аніон, кількість якого прямо пропорційна вмісту SH-груп [7]. Загальну антиокиснювальну активність плазми крові визначали за її здатністю гальмувати утворення продуктів пероксидного окиснення ліпідів у гомогенаті мозку щурів [5].

Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень

університету в програмному пакеті Statsoft STATISTIKA. Достовірність отриманих результатів визначали за критерієм Манна–Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Гіперпродукція вільних кисневих радикалів у тканинах організму призводить до активації процесів ліпопероксидації. МДА є одним із продуктів, що утворюються в процесі пероксидації ліпідів, тому його вміст у біологічному середовищі може слугувати непрямим маркером інтенсивності генерації активних форм кисню [8]. Ми спостерігали підвищення рівня МДА в сироватці крові щурів, яким інтраперитонеально вводили 60 мг/кг наночастинок, починаючи з 3-ї год із моменту їх введення (рис. 1). При цьому тільки при застосуванні багатостінкових нанотрубок зміни вмісту МДА на 3-тю год експерименту були достовірними. Тенденція до підвищення активності процесів ліпопероксидації

утримувалася до 6-ї год досліджу. В цей термін вміст МДА у сироватці крові тварин, яким вводили одностінкові нанотрубки, становив $(10,6 \pm 0,9)$ мкмоль/л, що було в 1,4 раза більше, ніж у контрольних тварин $(7,5 \pm 0,4)$ мкмоль/л. Ще більшою мірою активність ліпопероксидації зростала через 6 год після застосування наночастинок у щурів, яким вводили багатостінкові нанотрубки. У крові таких тварин вміст МДА підвищувався, порівняно з контролем, в 1,5 раза і становив $(11,5 \pm 0,9)$ мкмоль/л. Необхідно відмітити, що при використанні фулеренів C_{60} , хоча і мала місце тенденція до активізації вільнорадикальних реакцій на 3-тю і 6-ту год експерименту, проте зміни виявилися статистично недостовірними. Як видно з діаграм, наведених на рисунку 1, через 24 год після введення всіх типів наночастинок інтенсивність ліпопероксидних процесів у піддослідних тварин поверталася до норми.

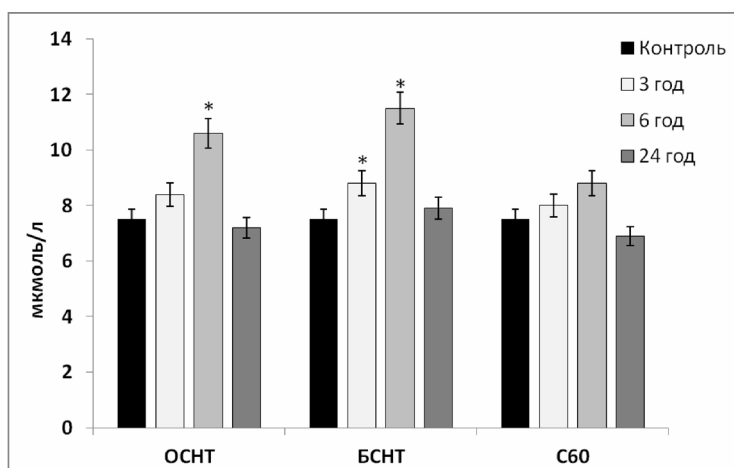


Рис. 1. Вплив карбонових наночастинок на вміст МДА в сироватці крові щурів (* – зміни достовірні порівняно з контролем).

Активність вільнорадикальних реакцій залежить не тільки від швидкості генерації вільних радикалів, але і від функціонування антиоксидантної системи, компоненти якої здатні перехоплювати і знешкоджувати радикальні форми кисню чи блокувати ланцюг ліпопероксидації. Одним з основних антиоксидантів неферментативної природи є відновлений глутатіон, функція якого полягає в елімінації з тканин токсичного перекису водню чи гідропероксидів. Дефіцит відновленого глутатіону в тканинах чи крові призводить до вираженого оксидативного стресу. Тому доцільно було дослідити вплив карбонових наночастинок на динаміку вмісту даної сполуки в крові тварин. Як видно з даних, наведених на рисунку 2, інтраперитонеальне введення щурам одно- і багатостінкових нанотрубок призводило до зниження вмісту в крові віднов-

леного глутатіону через 3 і 6 год з моменту ін'єкції. При цьому тільки на 6-ту год експерименту зміни досліджуваних показників виявилися достовірними. Так, у цей термін дослідження при застосуванні одностінкових нанотрубок рівень глутатіону в крові тварин був в 1,3 раза нижчим порівняно з контролем $(2,3 \pm 0,1)$ проти $(2,9 \pm 0,2)$ ммоль/л. У цей же період дослідження при введенні багатостінкових нанотрубок концентрація відновленого глутатіону знижувалася до $(2,1 \pm 0,1)$ ммоль/л, що становило 72 % від рівня контролю. Як і у випадку з МДА, рівень антиоксиданта повертався до норми через 24 год після застосування нанотрубок.

Порівняно з одно- і багатостінковими нанотрубками, фулерен C_{60} проявив найменший токсичний ефект – його інтраперитонеальне введення не справило достовірного ефекту на

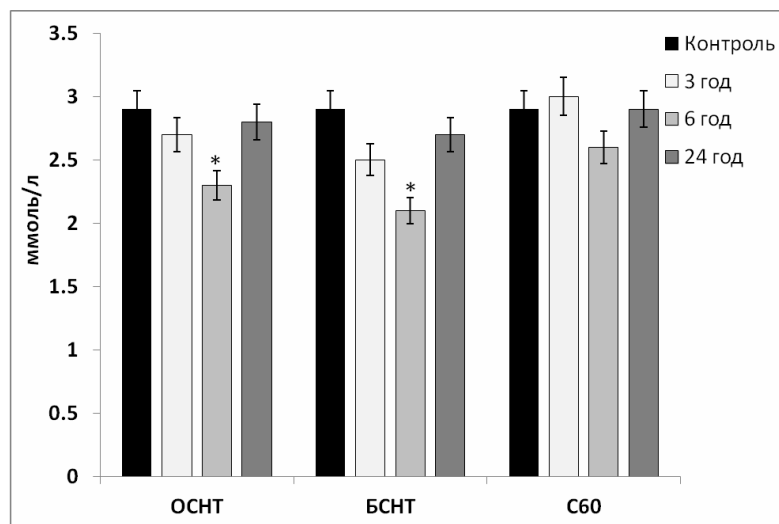


Рис. 2. Вплив карбонових наночастинок на вміст відновленого глутатіону в крові щурів (* – зміни достовірні порівняно з контролем).

показники вмісту відновленого глутатіону в крові щурів у всі терміни дослідження.

Загальна антиоксидантна активність плазми крові – це інтегральний показник, який відображає функціональний стан усіх компонентів антиоксидантної системи в комплексі. Ми досліджували вплив наночастинок на загальну антиоксидантну активність плазми крові за її здатністю гальмувати процеси ліпопероксидації в інкубаційному середовищі, яке містило гомогенат мозку щурів.

Представлені на рисунку 3 результати показують, що плазма здорових щурів інгібувала процеси вільнорадикального окиснення на 64 %, тобто в інкубаційному середовищі, яке містило досліджувану плазму, вміст ТБК-активних продуктів був у 2,6 раза нижчим, ніж у

пробах без плазми. Введення в черевну порожнину тварин фулерену С₆₀, одно- і багатостінкових нанотрубок не супроводжувалося статистично достовірними змінами загальної антиоксидантної активності плазми крові в ході термінів дослідження, хоча тенденція до зниження даного показника мала місце, особливо через 6 год з моменту застосування наночастинок. З огляду на такі результати і беручи до уваги факт зниження рівня відновленого глутатіону в крові під впливом карбонових наночастинок, зокрема одно- і багатостінкових нанотрубок, можна зробити висновок, що загальна антиоксидантна активність плазми крові залежить від функціонального стану багатьох компонентів антиоксидантної системи і питома вага відновленого глутатіону, оче-

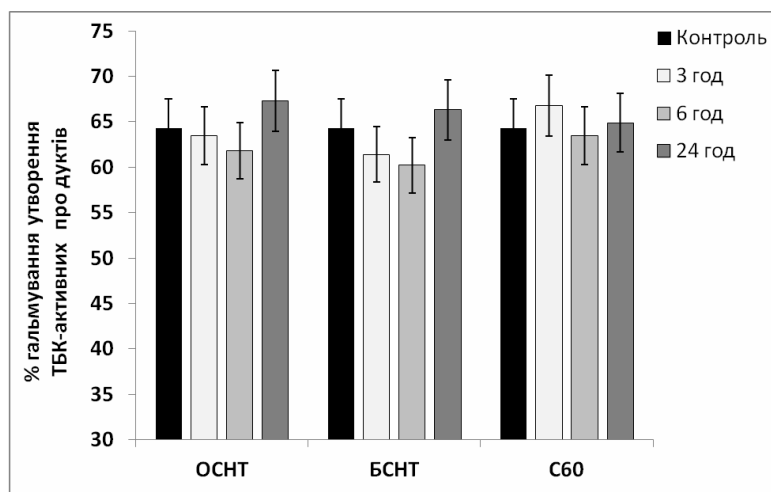


Рис. 3. Вплив карбонових наночастинок на загальну антиоксидантну активність плазми крові щурів.

видно, не є визначальною у цьому інтегральному показнику [9, 10].

ВИСНОВКИ. Токсична дія карбонових наночастинок опосередковується посиленням

продукуванням вільних кисневих радикалів і активацією процесів ліпідної пероксидації в сироватці крові. За ступенем токсичності карбонові наночастинок розміщуються в такому порядку: БСНТ>ОСНТ>C₆₀.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
2. Чекман І. С. Наногенотоксикологія: вплив наночастинок на клітину / І. С. Чекман, М. О. Говоруха, А. М. Дорошенко // Укр. мед. часопис. – 2011. – № 1. – С. 30–35.
3. Шаторна В. Ф. Нанотехнології, наномедицина, нанобіологія – погляд на проблему / В. Ф. Шаторна // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 1. – 2 (99). – С. 40–44.
4. Applications of Functionalized Fullerenes in Tumor Theranostics / Z. Chen, L. Ma, Y. Liu, C. Chen // Theranostics. – 2012. – 2. – P. 238–250.
5. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids / J. Stock, J. M. Gutteridge, R. J. Sharp, I. L. Dormandy // Clin. Sci. and Mol. Med. – 1974. – 47. – P. 215–222.
6. Blood oxidative stress generation after intraperitoneal administration of functionalized single-walled carbon nanotubes in rats / S. Clichici, T. Mocan, A. Filip, A. Biris // Acta Physiologica Hungarica. – 2011. – 98, N 2. – P. 231–241.
7. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. of Bioch. and Biophys. – 1959. – 82. – P. 70–77.
8. Jiao F. Studies on anti-tumor and antimetastatic activities of fullerene in a mouse breast cancer model / F. Jiao, Y. Liu, Y. Qu // Carbon. – 2010. – 48. – P. 2231–2243.
9. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress / A. Shvedova, A. Pietroiusti, B. Fadeel, V. E. Kagan // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2012. – 261, № 2. – P. 121–133.
10. Pojlak-Blazi M. Cell oxidative stress: risk of metal nanoparticles / M. Pojlak-Blazi, M. Jaganjac, N. Zarkovic // Handbook of Nanophysics: Nanomedicine and Nanorobotics. – 2010. – CRC Press, New York, NY, USA. – P. 1–17.
11. Review of fullerene toxicity and exposure – Appraisal of a human health risk assessment, based on open literature / K. Aschberger, H. J. Johnston, V. Stone, R. J. Aitken // Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2010. – 58. – P. 455–473.
12. The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity / H. J. Johnston, G. R. Hutchison, F. M. Christensen, K. Aschberger // Toxicological Sciences. – 2010. – 114, N 2. – P. 162–182.

С. А. Ястремская, Л. М. Палица, И. М. Ястремская, В. М. Коробчук, М. М. Корда
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

РОЛЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В РЕАЛИЗАЦИИ ТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА КАРБОНОВЫХ НАНОЧАСТИЦ

Резюме

Изучено влияние внутрибрюшного введения карбоновых наночастиц на генерацию свободных радикалов кислорода и функционирование антиоксидантной системы в организме экспериментальных животных. Показано, что под влиянием одно- и многостеночных нанотрубок активируются процессы липопероксидации в сыворотке крови, а содержание антиоксиданта восстановленного глутатиона снижается. Фуллерены не влияли достоверно на параметры интенсивности оксидативного стресса. Сделан вывод, что оксидативный стресс является одним из механизмов токсичности карбоновых нанотрубок при их попадании в кровь.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксидативный стресс, карбоновые наночастицы, процессы липопероксидации, антиоксидантная система.

S. O. Yastremska, L. M. Palytsia, I. M. Yastremska, V. M. Korobchuk, M. M. Korda
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN THE IMPLEMENTATION OF TOXIC EFFECTS OF CARBON NANOPARTICLES

Summary

It has been studied the effect of carbon nanoparticles intraperitoneal administration on the generation of oxygen free radicals and antioxidant system functioning in the organisms of experimental animals. It has been shown that single walled and multi walled nanotubes activate the lipid peroxidation processes as well as decrease the level of reduced glutathione in blood serum. Fullerenes did not affect the parameters. It has been concluded that oxidative stress is one of the mechanisms of carbon nanotubes toxicity when they are released into the blood.

KEY WORDS: **oxidative stress, carbon nanoparticles, lipid peroxidation processes, antioxidant system.**

Отримано 09.07.14

Адреса для листування: С. О. Ястремська, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.