

С.В. Клинова – к.б.н., заведующий лабораторией промышленной токсикологии  
Ю.М. Сутункова – лаборант отдела

### **Information about the authors**

L.V. Shabardina\* – assistant of the Department

Y.V. Ryabova – Head of the Department of Scientific basis of Bioprophylaxis

S.V. Klinova – PhD in Biological Sciences, Head of the Department of Industrial Toxicology

Y.M. Sutunkova – assistant of the Department

**\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

shabardinalv@ymrc.ru

**УДК 615.9**

### **ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА СВИНЦА У КРЫС ПОСЛЕ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ЭКСПОЗИЦИИ**

Иван Петрович Ющенко, Иван Глебович Шеломенцев, Юлия Владимировна  
Рябова, Светлана Владиславовна Клинова

Екатеринбургский медицинский научно-исследовательский центр  
профилактики и охраны здоровья промышленных рабочих  
Екатеринбург, Россия

### **Аннотация**

**Введение.** Наночастицы обладают высоким токсическим потенциалом из-за своих физико-химических свойств. Свинец является широко распространенным загрязнителем. При некоторых производственных процессах (сварка, металлургия и т.д.) образуются металлооксидные наночастицы. **Цель исследования** – оценка нейротоксического действия наночастиц оксида свинца на крыс после субхронического интраназального введения их крысам. **Материал и методы.** Суспензию наночастиц оксида свинца вводили в каждый носовой проход крыс три раза в неделю в течение 6 недель. Оценка нейротоксического действия наночастиц проводилась с использованием поведенческих тестов «Открытое поле» и суммационно-порогового показателя, а также биохимических показателей уровня белка миелина в сыворотке крови. Электронная микроскопия использовались для установления и описания формы и размера частиц, а также для исследования морфологических изменений миелиновых оболочек аксонов. **Результаты.** Согласно результатам поведенческих тестов, исследовательская и двигательная активности крыс, подвергшихся воздействию НЧ PbO, были ниже, чем в контрольной группе. Уровень основного белка миелина в сыворотке крови крыс после воздействия НЧ PbO повысился, снизилась масса головного мозга. Электронная микроскопия показала, что воздействие наночастиц оксида свинца привело к увеличению числа аксонов с поврежденной миелиновой оболочкой. **Обсуждение.** Увеличение количества аксонов с повреждением миелиновой оболочки вместе с увеличением содержания основного белка миелина в сыворотке крови и склонностью к изменению поведенческих реакций

свидетельствуют об угнетении центральной нервной системы подвергшихся воздействию животных. **Выводы.** Проведенное исследование демонстрирует, что даже низкоуровневые воздействия наночастиц оксида свинца при интраназальном поступлении вызывают повреждения в центральной нервной системе крыс.

**Ключевые слова:** наночастицы, оксид свинца, центральная нервная система, головной мозг, крысы

## **NEUROTOXIC EFFECTS OF LEAD OXIDE NANOPARTICLES IN RATS AFTER SUBCHRONIC INTRANASAL EXPOSURE**

Ivan G. Shelomencev, Yuliya V. Ryabova, Ivan P. Yushchenko, Svetlana V. Klinova  
Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers  
Yekaterinburg, Russia

### **Abstract**

**Introduction.** Lead is a widespread pollutant. Some manufacturing processes produce lead nanoparticles (NP). Nanoparticles have a high toxic potential due to their physical and chemical properties. **The purpose of the study** -evaluation of the neurotoxic effect of PbO NPs on rats after subchronic intranasal exposure. **Material and methods.** Suspension of lead oxide nanoparticles were injected into each nasal passage of rats three times a week for 6 weeks. Neurotoxic effect of nanoparticles evaluated with using the behavioral tests "Open field" and the summation-threshold indicator, and with biochemical indicators of myelin protein level. Electron microscopy were used to describe the particle shape and size, and morphological changes in the myelin sheaths. **Results.** Behavioral tests showed a decrease of the exploratory and motor activities of rats exposed to PbO NPs. The level of myelin basic protein in the blood serum after exposure to PbO NPs increased, the weight of the brain decreased. The electron microscopy showed an increase of axons with a damaged myelin sheath, after PbO NPs exposure. **Conclusions.** The current study demonstrate that even low-level exposure to lead oxide nanoparticles during intranasal intake causes damage in the central nervous system of rats.

**Keywords:** nanoparticles, lead oxide, central nervous system, brain, rats

### **ВВЕДЕНИЕ**

Свинец (Pb) и его соединения являются широко распространенными загрязнителями воздуха рабочей зоны и окружающей среды. При многих производственных и техногенных процессах образуются наночастицы (НЧ). Yang и соавт., обобщая результаты производственного контроля загрязнения воздуха рабочих помещений при выплавке черновой меди, показали, что к приоритетным загрязнителям могут быть отнесены наночастицы оксида свинца (НЧ PbO) [1]. Наночастицы обладают высоким токсическим потенциалом из-за своих физико-химических свойств [2]. Появляется все больше доказательств воздействия различных загрязнителей воздуха, включая мелкие частицы, на центральную нервную систему и деятельность мозга [3].

Передача электрических импульсов в центральной нервной системе (ЦНС) происходит благодаря миелиновой оболочке, которая не защищает аксон, но и увеличивает скорость проведения нервного импульса [4]. Разрушение миелина в клетках центральной нервной системы человека подчеркивается широким спектром тяжелых неврологических расстройств, таких как лейкодистрофия, рассеянный склероз (РС) [5]. Дезорганизованный и поврежденный миелин может активировать микроглию, которая сохраняет и усугубляет его повреждения за счет высвобождения медиаторов воспаления [6].

**Цель исследования** – оценка нейротоксического действия наночастиц оксида свинца на крыс после субхронического интраназального поступления.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

Суспензия наночастиц оксида свинца была подготовлена в Центре коллективного пользования «Современные нанотехнологии» Уральского федерального университета, путем импульсной лазерной абляции тонких металлических листов 99,99% чистого свинца в стерильной деионизированной воде.

Электронная микроскопия использовались для установления и описания формы и размера частиц. Средний диаметр взвешенных наночастиц оксида свинца равнялся  $49,6 \pm 16$  нм. А также для исследований морфологических изменений состояния миелиновых оболочек аксонов.

Эксперимент проводился на 3-4-месячных беспородных самках крыс с массой тела около 200 г, разделенных на две группы по 14 животных в каждой. Крыс держали в специально оборудованной комнате вивария в соответствии с Международными руководящими принципами биомедицинских исследований с участием животных, разработанными CIOMS и ICLAS (2012). 50 мкл суспензии наночастиц оксида свинца в концентрации 0,5 мг/мл вводили в каждый носовой проход фиксированных экспериментальных животных три раза в неделю в течение 6 недель без анестезии. Контрольной группе вводили тот же объем деионизированной воды.

Поведенческие реакции животных изучали в тесте «Открытое поле». Оценивали исследовательскую активность, общую двигательную активность и уровень тревожности. Время тестирования одного животного 5 минут, в течение которых фиксировались количество заглядываний в «норки», число дефекаций и число пересеченных квадратов в «открытом поле». В конце экспериментального периода для оценки процессов торможения прохождения импульсов в нервной использовали суммационно-пороговый показатель. Уровень основного белка миелина в сыворотке крови определяли с помощью диагностического набора ELISA Kit for Myelin Basic Protein (Cloud-Clone Corp, USA).

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программного обеспечения Statistica компании StatSoft. Значимость различий между группами определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Разница между средними значениями считалась статистически значимой, если вероятность ее случайного возникновения была ниже 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

Согласно результатам поведенческих тестов, исследовательская и двигательная активности крыс, подвергшихся воздействию НЧ РbO в конце экспериментального периода, были на 16% и 12% меньше, чем в контрольной группе соответственно. Они оценивались по количеству заглядываний в «норки» и суммации всей двигательной активности животных во время теста (Рис. 1А,Б). Количество испражнений во время теста «Открытое поле» увеличилось на 28% (Рис. 1В).

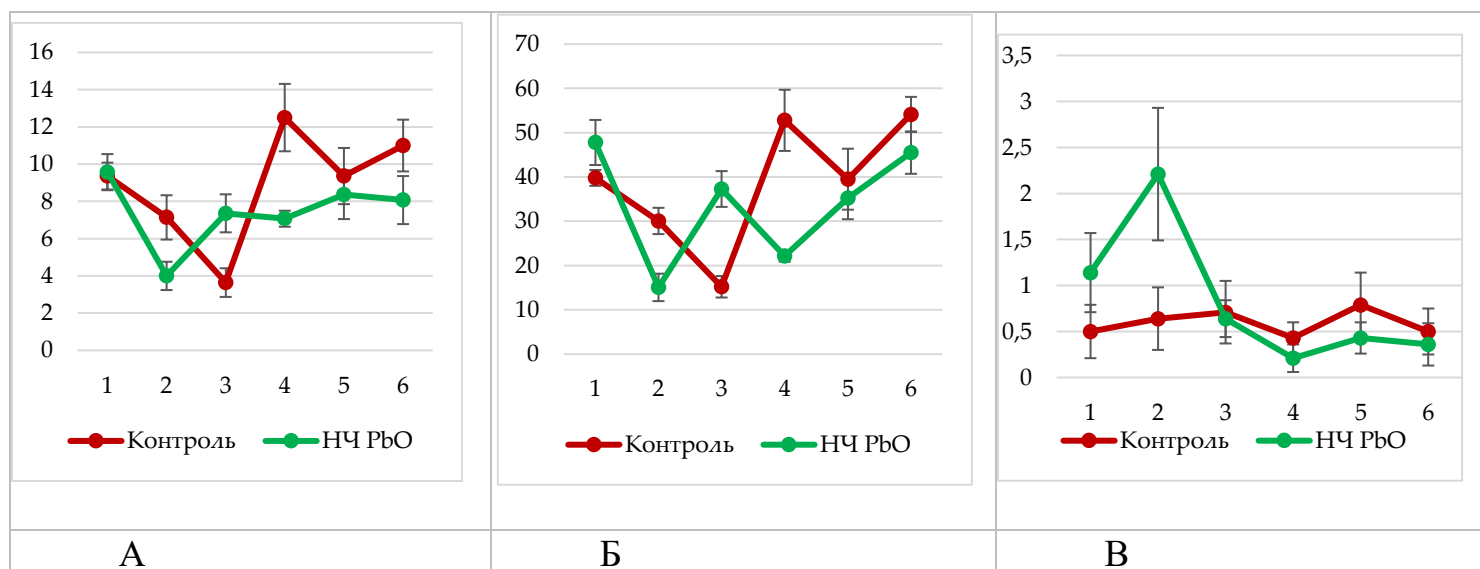


Рис.1. Результаты поведенческого теста «Открытое поле»: (А) количество заглядываний в «норки» (Б) двигательная активность; (В) количество испражнений. Ось абсцисс показывает время экспозиции в неделях, ось ординат показывает величину эффекта.

После окончания эксперимента суммационно-пороговый показатель у опытной группы был повышен на 1,5%, в сравнении с контрольной группой. Уровень основного белка миелина в сыворотке крови после воздействия НЧ РbO повысился на 34%, снизилась масса головного на 5,7% ( $p < 0,05$ ).

С помощью электронной микроскопии были обнаружены НЧ РbO в тканях обонятельных луковиц головного мозга крыс. В обонятельных луковицах и базальных ганглиях были показаны морфологические изменения миелиновых оболочек аксонов: кратерные отверстия различного диаметра (Рис.2).

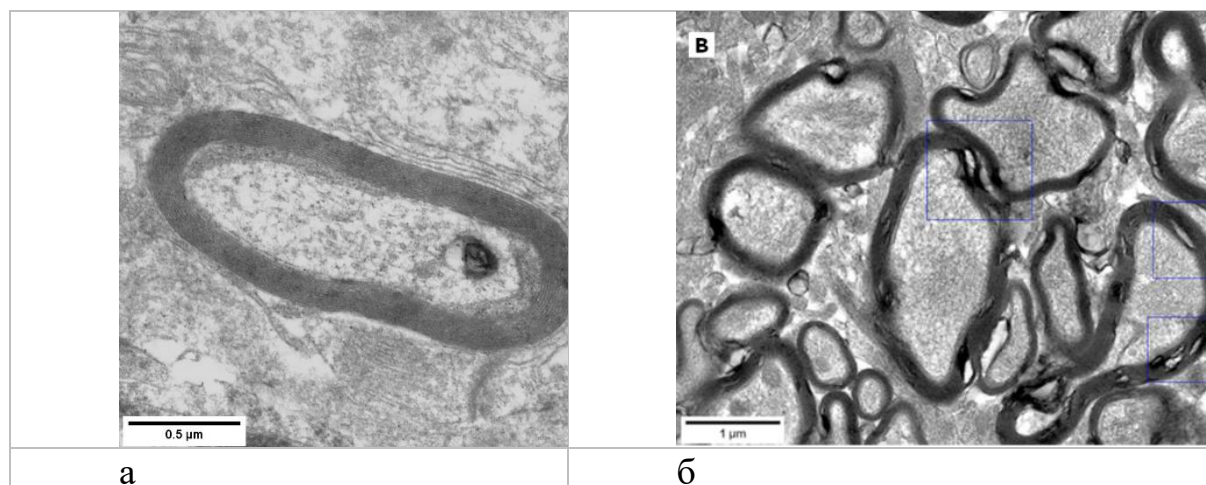


Рис.2 Изображение нормальных (а) и поврежденных (б) миелиновых морфотипов (синим выделены участки повреждения миелина).

Исследование ультраструктуры миелиновой оболочки аксонов показало увеличение на 19% и 21,8% количества аксонов с поврежденной миелиновой оболочкой в обонятельных луковицах и базальных ганглиях животных по сравнению с контрольной группой.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на отсутствие статистической значимости, были получены однонаправленные изменения поведенческих реакций животных после субхронического интраназального воздействия НЧ РbO. Мы наблюдали снижение исследовательской и общей двигательной активности, а также увеличение суммационно-порогового показателя у крыс, подвергшихся воздействию наночастиц, по сравнению с контрольной группой, что говорит о преобладании тормозных процессов в центральной нервной системе и повреждении структур головного мозга. Также выявлено увеличение актов дефекации во время проведения теста «открытое поле» у опытной группы животных, что может указывать на повышенный стресс (Рис. 2). Повышение уровня основного белка миелина в сыворотке крови на 34% и статистически значимое снижение массы мозга на 5,7% ( $p < 0,05$ ) после воздействия НЧ РbO указывает на разрушение миелиновой оболочки нервных волокон.

Мы наблюдали аналогичные изменения в исследовательском поведении крыс в наших предыдущих исследованиях при ингаляционном воздействии наночастиц оксида свинца [7]. Полученные данные свидетельствуют в пользу взаимозаменяемости моделей изучения токсического действия наночастиц на здоровье (интраназальной и ингаляционной). Изменения в поведении могут быть обусловлены нарушением целостности миелиновой оболочки, что приводит к ошибкам передачи сигнала аксонами. В проведенном исследовании было показано разрушение миелиновой оболочки аксонов на ультраструктурном уровне. Обнаруженные изменения представлены деградацией миелиновой оболочки аксонов с увеличением доли цитоплазмы в поврежденном участке и нарушением ее целостности. Было установлено, что

доля аксонов с нарушенной миелиновой оболочкой увеличивалась после интраназального воздействия на животных суспензии НЧ РbО.

Подобные нарушения миелиновой оболочки были описаны ранее в обонятельных луковицах головного мозга крыс после ингаляционного воздействия наночастиц свинца [5]. Данное исследование, однако, отличается большим объемом полученных данных.

### **ВЫВОДЫ**

1. Изменение поведенческих реакций, у животных подвергшихся интраназальному воздействию НЧ РbО, свидетельствует о повреждении структур центральной нервной системы и преобладании тормозных процессов. Это подтверждают результаты теста «Открыто поле» и снижение суммационно-порогового показателя. В пользу взаимосвязи упомянутых реакций с разрушением миелиновой оболочки нервных волокон говорит и повышение уровня основного белка миелина в сыворотке крови, а также статистически значимое уменьшение массы головного мозга крыс после воздействия на них НЧ РbО.

2. Результаты электронной микроскопии показали, что субхроническое интраназальное воздействие на крыс НЧ РbО привело к отложению НЧ в обонятельной луковице и увеличению числа аксонов с поврежденной миелиновой оболочкой.

3. Проведенные исследования демонстрируют, что даже низкоуровневые воздействия наночастиц оксида свинца при интраназальном поступлении вызывают значительные повреждения в центральной нервной системе крыс.

### **СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Nanoparticle toxicology /W. Yang, L. Wang, E. M Mettenbrink [et al.]// Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2021. – Vol. 61. – № 1. –P. 269-289. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032320>
2. Nanomaterials and nanoparticles: structure, physic-chemical and toxicological properties, impact on the organism of the workers / O. P Yavorovsky, V. STkachyshyn, O. MArustamian [et al.] //Environ Heath. – 2016. – Vol. 3. – P. 29-36.
3. Outdoor ambient air pollution and neurodegenerative diseases: the neuroinflammation hypothesis / R. L Jayaraj, E. A Rodriguez, Y. Wang [et al.] //Curr. Envir. Health Rpt. –2017. – Vol. 4. –P. 166-179. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40572-017-0142-3>.
4. Enhanced cerebellar myelination with concomitant iron elevation and ultrastructural irregularities following prenatal exposure to ambient particulate matter in the mouse / C. Klocke, V. Sherina, U. M Graham[et al.] //Inhal. Toxicol. – 2018. – Vol. 30. –P. 381-396. DOI: <https://doi.org/10.1080/08958378.2018.1533053>.
5. Manifestation of systemic toxicity in rats after a short-time inhalation of lead oxide nanoparticles / M. P Sutunkova, S. N Solovyeva, I. N Chernyshov[et al.] //Int. J. Mol. Sci. –2020. – Vol. 21. – P. 690. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21030690>.
6. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system / A. Elder, R.Gelein, V. Silva [et al.] //Environ. Health Perspect. –2006. – Vol. 114. –P. 1172-1178. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.9030>.

7. In vivo toxicity of copper oxide, lead oxide and zinc oxide nanoparticles acting in different combinations and its attenuation with a complex of innocuous bio-protectors / I. A Minigalieva, B. A Katsnelson, V. G Panov [et al.] //Toxicology. –2017. – Vol. 308. –P. 72-93. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.02.007>.

#### **Сведения об авторах**

И. П. Ющенко – младший научный сотрудник отдела токсикологии и биопрофилактики

И. Г. Шеломенцев – научный сотрудник отдела молекулярной биологии и электронной микроскопии

Ю.В.Рябова – заведующий лабораторией научных основ биологической профилактики, научный сотрудник

С. В. Клинова – заведующий лабораторией промышленной токсикологии, научный сотрудник

#### **Information about the authors**

I. P. Yushchenko – research assistant, Department of Toxicology and Bioprophylaxis

I. G. Shelomentsev – researcher, Department of Molecular Biology and Electron Microscopy

Y.V. Ryabova – Head of the Laboratory of Scientific Foundations of Bioprophylaxis, researcher

S. V. Klinova – Head of the Laboratory of Industrial Toxicology, researcher