

УДК 577.25

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ НА СИРИЙСКИХ ХОМЯЧКОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ *Opisthorchis felineus*: ¹H МРС ИССЛЕДОВАНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2020 г. М. Н. Львова^{1,*}, О. Б. Шевелев^{1,2}, В. В. Сердобинцева³, Д. В. Калинин³, Д. А. Старостенко⁴, Е. Л. Завьялов¹, А. Л. Кривошапкин⁵, Академик РАН П. В. Логачев⁴, В. А. Мордвинов¹, Д. Ф. Августинович^{1,6}

Поступило 09.07.2020 г.

После доработки 30.07.2020 г.

Принято к публикации 31.07.2020 г.

В последние годы наночастицы диоксида кремния широко используют в медицине и фармацевтической промышленности, однако, их влияние на мозг практически не исследовано. Мы оценивали эффекты длительного потребления наночастиц аморфного диоксида кремния (ДОК) (размер 5 нм) сирийскими хомячками, инфицированными трематодами *Opisthorchis felineus*, на гиппокамп и фронтальную кору мозга. Спектроскопическое определение нейрометаболитов головного мозга, выполненное с помощью магнитно-резонансной томографии с индукцией магнитного поля 11.7 Тесла, показало, что соотношение возбуждающих нейромедиаторов (глутамат + глутамин + аспарат) к тормозным (ГАМК + глицин) было выше у животных, инфицированных *O. felineus*, а предварительное потребление раствора ДОК предотвращало этот дисбаланс. Кроме того, обнаружено протекторное влияние ДОК на уровень мио-инозитола и глицина. Сделан вывод о том, что применение ДОК может нивелировать негативные последствия на мозг, обусловленные инфекционными факторами.

Ключевые слова: наночастицы, аморфный диоксид кремния, головной мозг, *Opisthorchis felineus*

DOI: 10.31857/S2686738920060189

Диоксид кремния широко используют в фармацевтической и пищевой промышленности. Наночастицы диоксида кремния проникают в организм через кишечник, легкие и кожу [1] и могут влиять на любой орган, в том числе на мозг. В последнем случае их рассматривают в качестве по-

тенциально многообещающего агента для разработки лечения онкологических заболеваний головного мозга [2] или в качестве системы доставки лекарств, например, при болезни Паркинсона [3]. Это связано с уникальными физико-химическими свойствами этих наночастиц: высокопористая структура, легко изменяемая площадь поверхности за счет изменения размера получаемых частиц и объема пор, биосовместимость и стабильное удержание лекарственного средства в порах [3]. Аморфный диоксид кремния распространен в природе гораздо меньше, чем кристаллический, но его широко используют в косметической промышленности и биомедицине благодаря его лучшей (на 2–3 порядка) растворимости в воде [4]. Однако в работах *in vitro* показаны возможные негативные эффекты проникновения в мозг этих аморфных наночастиц, обусловленные активацией микроглии, генерирующей активные формы кислорода и азота и повышенную экспрессию провоспалительных маркеров [5].

В институте геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН был разработан способ получения минеральной кремниевой воды,

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Международный томографический центр Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Институт ядерной физики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁵ Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

⁶ Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

*e-mail: lvovamaria@mail.ru

содержащей аморфные наночастицы диоксида кремния (ДОК) малого размера, которые являются химически нетоксичным инертным материалом [6]. Учитывая способность диоксида кремния связывать экзо- и эндотоксины, патогенные антигены и аллергены микробного происхождения [7], представлялось перспективным использование ДОК в исследованиях, связанных с описторхозом, учитывая то, что экскреторно-секреторный продукт гельминтов (белки, продукты жизнедеятельности паразитов, содержащее их кишечника, компоненты тегумента) обуславливает воспаление гепатобилиарной системы организма хозяина, модулирует иммунный ответ. Считается, что описторхоз, как системное заболевание, способствует развитию не только патологии печени – основного органа паразитирования гельминтов и селезенки – основного периферического органа иммунной системы, но и мозга [8]. Поэтому целью работы было моделирование *O. felineus*-описторхоза у животных, которым предварительно длительно спаивали раствор с ДОК, с последующим определением состояния печени, иммунных органов (селезенка, тимус) и мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы половозрелые самцы сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*), полученные в ЦКП SPF-вивария ИЦиГ СО РАН. Животных содержали индивидуально в клетках $36 \times 23 \times 12$ см при световом режиме 12 ч : 12 ч (свет : темнота), 23–24°C и достаточном количестве корма и питья. Все процедуры проведены согласно директивам European Communities Council от 24 ноября 1986 г. (86/609/ЕЕС) и заключению Биоэтической комиссии ФИЦ ИЦиГ СО РАН (протокол № 39 от 27 сентября 2017 г.).

Животных поделили на 2 группы, одна в течение 2.5 мес. пила воду, вторая – воду с ДОК (3×10^{10} частиц/г массы тела/сутки), размер наночастиц был 5 нм. Затем животных каждой группы вновь разделили на две подгруппы. Каждому животному одной из подгрупп внутрижелудочно были введены 100 метацеркарий *O. felineus*, предварительно выделенные из инфицированных язей, выловленных из реки Обь вблизи г. Новосибирска. Через 3 мес. после заражения сравнивали животных 4-х групп: 1) контрольные (КОН) – неинфицированные, пьющие воду ($n = 5$); 2) *O. felineus*-инфицированные (OF), пьющие воду ($n = 5$); 3) ДОК – неинфицированные, пьющие воду с наночастицами ДОК ($n = 4$); 4) OF + ДОК – *O. felineus*-инфицированные и пьющие воду с наночастицами ДОК ($n = 4$).

За месяц до окончания экспериментов исследовали относительный уровень нейрометаболитов в мозге хомячков с использованием оборудо-

вания ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023) горизонтального томографа (Biospec 117/16 USA, Bruker, Германия) с индукцией магнитного поля 11.7 Тесла. Определяли уровни метаболитов в префронтальной области коры головного мозга, отвечающего за сложные формы поведения, и в гиппокампе, лимбической структуре, отвечающей за эмоции и память. МРТ исследование было проведено по стандартной ранее описанной методике [9]. Размер спектроскопических вокселей составлял $1.6 \times 3.5 \times 3.5$ мм (рис. 1а, б). Все протонные спектры (рис. 1в) получены с помощью пространственно-локализованной одновоксельной спектроскопии (MPC) методом STEAM (stimulated echo acquisition mode spectroscopy) с параметрами импульсной последовательности TE = 3 мс, TR = 5 с и количеством накоплений 120. Для обработки экспериментальных спектров ^1H MPC и определения количественного состава метаболитов использовали описанные ранее программы [9, 10]. Уровни отдельных метаболитов представлены относительно суммы всех метаболитов.

В конце эксперимента животных умерщвляли декапитацией, регистрировали массу тела, печени, селезенки и тимуса, а также подсчитывали число гельминтов у инфицированных хомячков.

Результаты статистически обработаны с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (“Statistica-6.0”): первый фактор “вещество” (вода или вода с ДОК), второй фактор “инфекция” (инфицированные и неинфицированные). Данные представлены как среднее \pm SEM. Различия между животными считались статистически значимыми при $p < 0.05$ и на уровне тенденции при $0.05 < p < 0.1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что ни длительное потребление воды с ДОК, ни введение метацеркарий *O. felineus* не влияют на прирост массы тела и относительную массу тимуса у экспериментальных животных (рис. 2а, б). В то же время, относительные массы печени и селезенки у всех инфицированных хомячков были увеличены, в обоих случаях влияние фактора “инфекция” было существенным (рис. 2в, г). Эти показатели не менялись на фоне постоянного потребления ДОК. Длительное потребление воды с ДОК не препятствовало успешному внедрению и приживаемости гельминтов в печени животных, поскольку количество паразитов в печени у хомячков из групп OF и OF + ДОК было одинаковым (31.4 ± 2.6 и 33.5 ± 7.5 соответственно). Эти данные позволяют предпо-

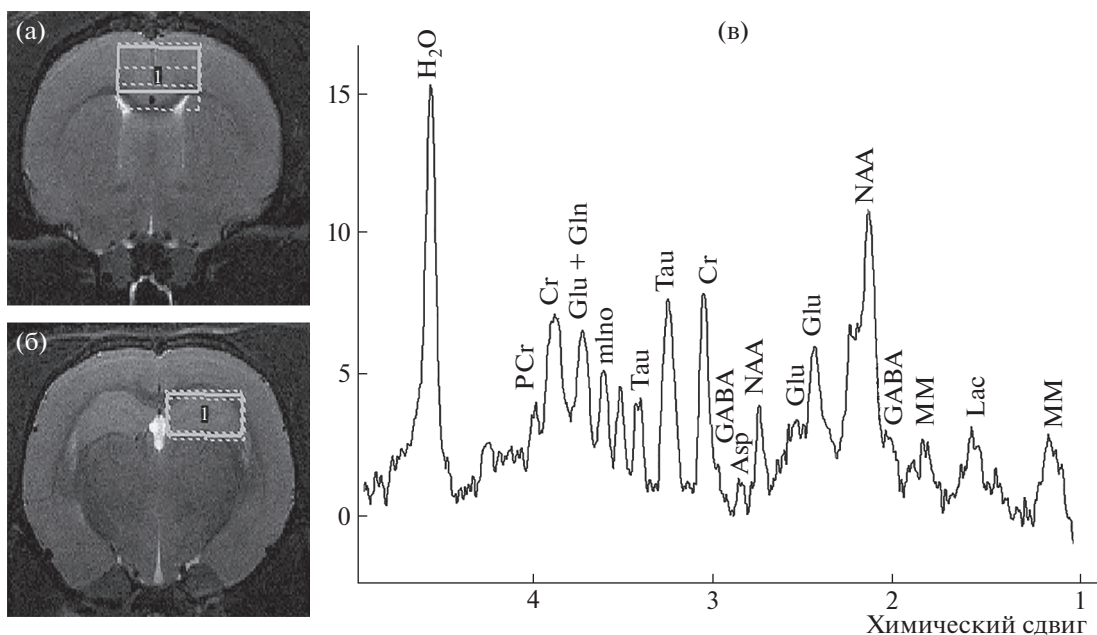


Рис. 1. Расположение вокселя для ^1H МРС коры головного мозга (а) и гиппокампа (б). Типичный ^1H МРС спектр (в). mIno – мио-инозитол; PCr – фосфокреатин; Cr – креатин; Glu – глутаминовая кислота; Gln – глутамин; Tau – таурин; Asp – аспарат; NAA – N-ацетиласпарат; GABA – гамма-аминомасляная кислота; MM – макромолекулы; Lac – лактат.

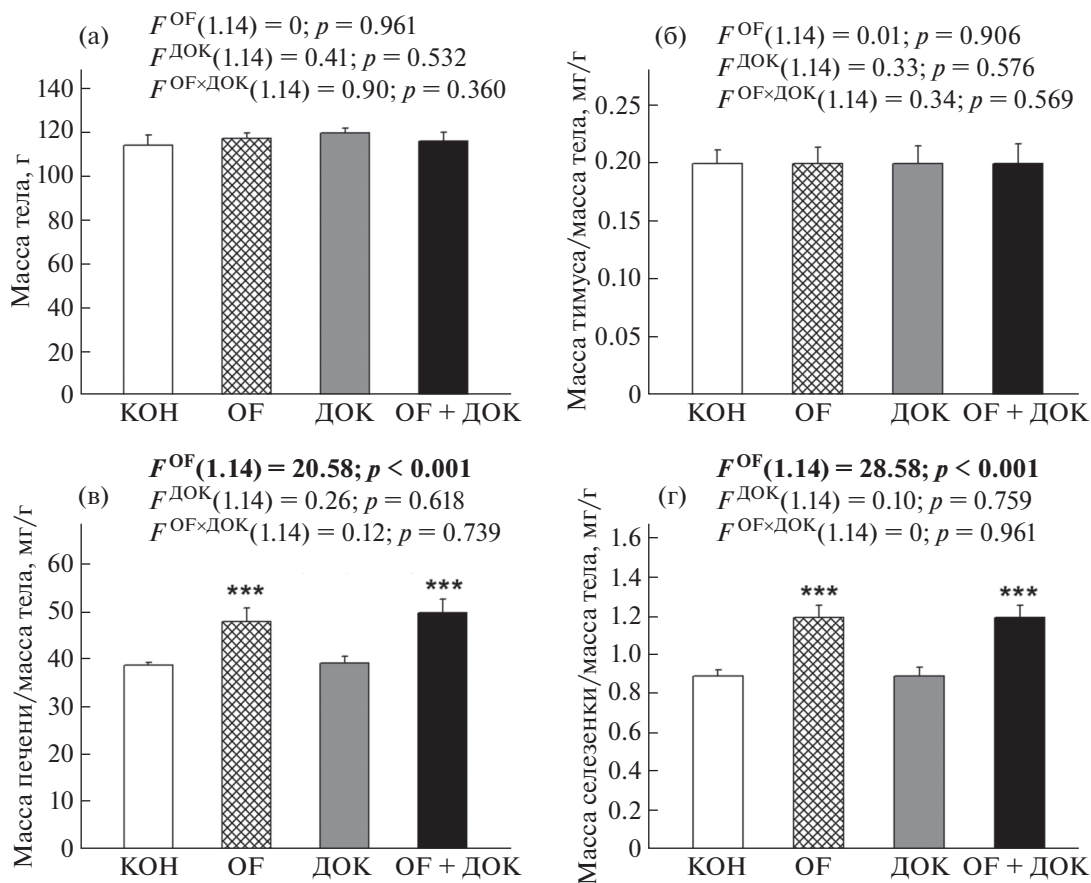


Рис. 2. Масса тела (а) и относительная масса тимуса (б), печени (в) и селезенки (г) у хомячков экспериментальных групп. *** $p < 0.01$ – по сравнению с КОН.

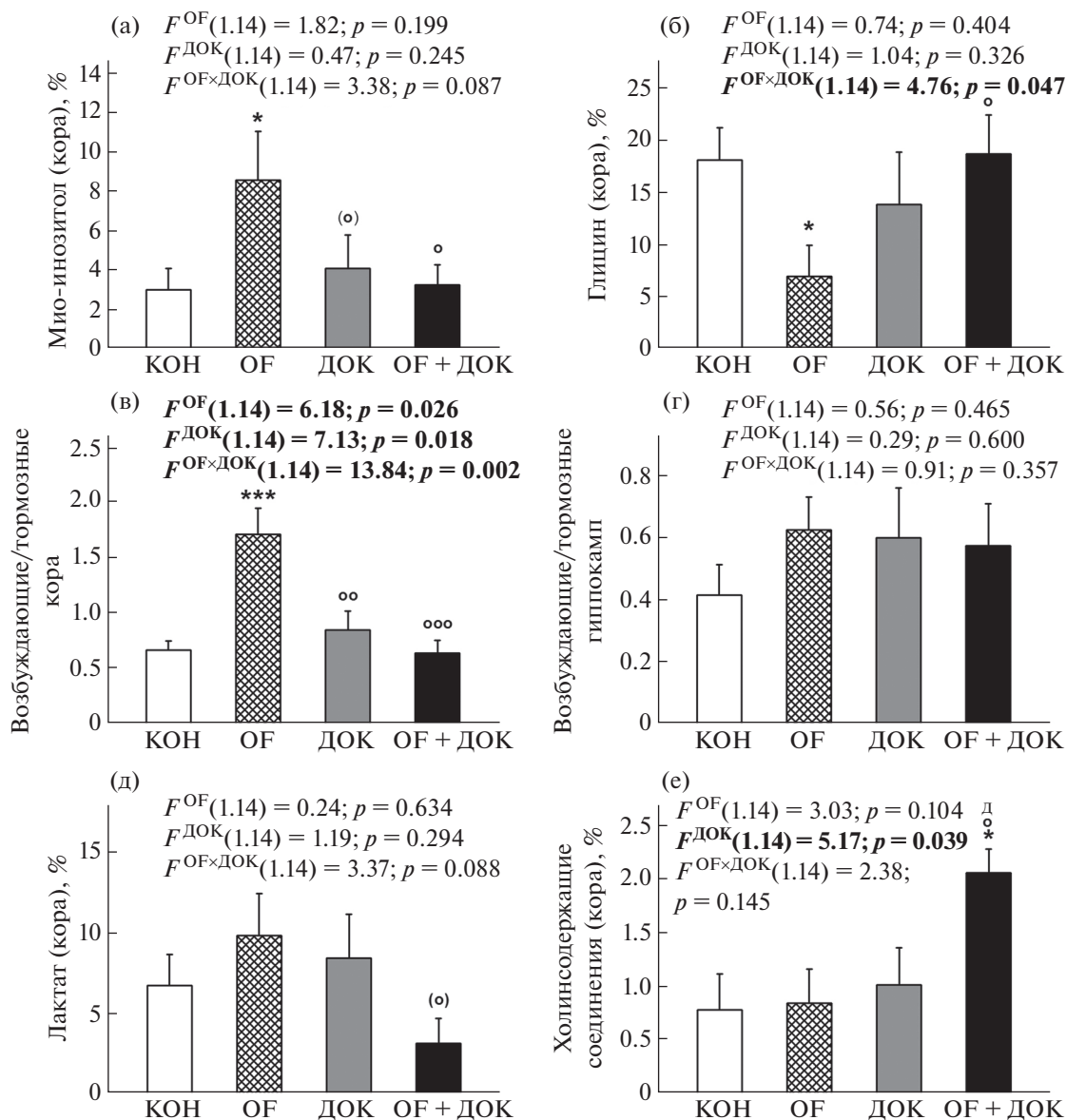


Рис. 3. Уровни мио-инозитола, глицина, лактата, холинсодержащих соединений в коре головного мозга, а также соотношение возбуждающих аминокислот к тормозным в коре и гиппокампе у хомячков экспериментальных групп. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ – по сравнению с КОН; ° $p < 0.05$; °° $p < 0.01$; °°° $p < 0.001$; (°) $0.05 < p < 0.1$ – по сравнению с OF; °° $p < 0.05$ – по сравнению с ДОК.

ложить, что наночастицы ДОК не оказывают периферический эффект.

При отсутствии периферических эффектов, употребление воды с наночастицами ДОК в течение 2.5 мес. и далее при 3-х месячном инфицировании животных оказало влияние на мозг (рис. 3). В коре мозга животных OF было обнаружено повышение мио-инозитола (рис. 3а), маркера астроглии, и снижение глицина (рис. 3б), тормозного нейромедиатора, а длительное потребление хомячками воды с ДОК нормализовало эти показатели. Рост и интенсивность первого сигнала может указывать на реактивную пролифера-

цию астроцитов, которая происходит на фоне инфекций и нейродегенеративных заболеваний [11]. Снижение уровня второго может свидетельствовать о преобладании процессов возбуждения в мозге инфицированных животных. Установленное взаимодействие двух факторов воздействия в отношении глицина свидетельствует о корректирующем протекторном влиянии ДОК в отношении этого показателя.

О преобладании процессов возбуждения над торможением в коре мозга инфицированных хомячков говорит и соотношение суммарно возбуждающих аминокислот (глутамат + глутамин +

+ аспарат) к тормозным (ГАМК + глицин) (рис. 3в). При этом длительное потребление воды с наночастицами ДОК снижает негативное влияние инфекции. Причем обнаружено статистически значимое взаимодействие двух факторов, свидетельствующее о защитном действии ДОК при нарушениях в коре мозга, обусловленных инфекционным агентом. В отличие от коры, в гиппокампе мозга, уровни возбуждающих и тормозных нейромедиаторов не менялись и это соотношение было приблизительно одинаковым у всех четырех групп сравниваемых животных (рис. 3г).

Уровень лактата, маркера гипоксии, не меняется в коре головного мозга животных всех групп, однако наблюдается тенденция к его снижению у инфицированных животных с длительным потреблением ДОК по сравнению с такими же хомячками, но пьющими воду (рис. 3д). Вероятно, хронический описторхоз, также как и печеночный шистосомоз, сопровождается изменениями энергетического обмена в коре головного мозга лабораторных животных [12], а длительное потребление ДОК способствует нормализации этого процесса.

Известно, что сигнал Cho на спектрограмме представляет собой сумму сигналов холинсодержащих соединений – фосфохолина, глицерофосфохолина и холина, причем основной вклад в этот сигнал в мозге вносит глицерофосфохолин [13]. Уровень этого сигнала был приблизительно одинаковым в коре головного мозга животных из групп OF и ДОК, однако сочетание двух факторов привело к значительному усилению сигнала (рис. 3е). Причина этого остается в настоящее время неясной. Как предполагают другие исследователи, это может быть связано с активацией астроцитоза, поскольку обнаруживают повышенные концентрации холина не в нейронах, а в глиальных клетках [14]. Исходя из того, что ДОК вносит существенный вклад в проявление этого признака у животных OF + ДОК, можно предположить, что предварительное потребление воды с наночастицами ДОК способствует повышению чувствительности астроцитов к последующему воздействию неблагоприятных факторов. Например, показано, что при поражениях печени повышается уровень NH_3 в крови настолько, что он может проходить через гематоэнцефалический барьер, усиливая поступление в мозг молекул, оказывающих токсическое действие на астроциты [15]. Установленные в нашем исследовании повышенные сигналы мио-инозитола в коре головного мозга хомячков из группы OF также подтверждают то, что мишенью при *O. felinae* инфекции становятся астроциты. Учитывая все это, можно предположить, что повышение сигналов холинсодержащих соединений у OF + ДОК животных является результатом протекторного действия ДОК, направленного на

пролиферацию астроцитов в мозге – основных глиальных клеток мозга, контролирующих метаболические процессы в нейронах.

Таким образом, проведенное исследование показало, что длительное превентивное потребление наночастиц аморфного диоксида кремния размером 5 нм не оказывает негативного влияния на физиологический статус здоровых хомячков и не нарушает биохимические процессы в мозге, оцениваемые по метаболическим показателям с помощью МРС-анализа. В то же время в коре головного мозга инфицированных животных эти наночастицы нормализуют соотношение возбуждающих и тормозных нейромедиаторов и препятствует изменению уровней мио-инозитола и лактата в мозге.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках проекта государственного задания ФИЦ ИЦиГ СО РАН (№ 0324-2019-0041) и проекта государственного задания ИХТТМ СО РАН (№ 0301-2019-0005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ali A., Suhail M., Mathew S., et al.* Nanomaterial Induced Immune Responses and Cytotoxicity. *J Nanosci Nanotechnol.* 2016. V. 16. P. 40–57. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.10885>
2. *Kusaczuk M., Krętownski R., Naumowicz M., et al.* Silica nanoparticle-induced oxidative stress and mitochondrial damage is followed by activation of intrinsic apoptosis pathway in glioblastoma cells. *Int J Nanomedicine.* 2018. V. 13. P. 2279–2294. <https://doi.org/10.2147/IJN.S158393>
3. *Guzman-Ruiz M.A., de La Mora M.B., Torres X., et al.* Oral Silica Nanoparticles Lack of Neurotoxic Effects in a Parkinson's Disease Model: A Possible Nanocarrier? *IEEE Trans Nanobioscience.* 2019. V. 18. P. 535–541. <https://doi.org/10.1109/TNB.2019.2934074>
4. *Потапов В., Мурадов С., Сивашенко В., и др.* Нанодисперсный диоксид кремния: применение в медицине и ветеринарии. *Наноиндустрия.* 2012. Т. 33. № 3. С. 32–36
5. *Choi J., Zheng Q., Katz H.E., et al.* Silica-based nanoparticle uptake and cellular response by primary microglia. *Environ Health Perspect.* 2010. V. 118. P. 589–95. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901534>
6. *Калинин Д.В., Сердобинцева В.В.* Способ получения наночастиц кремнезема. Патент RU 2 426 692 С1. 2010. Бюл. № 23.
7. *Терёшин В.А., Круглова О.В., Нартов П.В., и др.* Эффективность энтеросорбента на основе диоксида кремния в терапии антибиотик-ассоциированной диареи. *Клиническая инфектология и паразитология.* 2019. Т. 8. № 1. С. 7–14.
8. *Ахмедов В.А., Кривевич М.А.* Хронический описторхоз как полиорганная патология. *Вестник*

- НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2009. Т. 7. № 1. С. 118–121.
9. *Shevelev O.B., Tseilikman V.E., Khotskin N.V., et al.* Anxiety and neurometabolite levels in the hippocampus and amygdala after prolonged exposure to predator-stress. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019. V. 23. P. 582–587. <https://doi.org/10.18699/VJ19.528>
 10. *Moshkin, M.P., Akulov, A.E., Petrovski, D.V., et al.* Proton magnetic resonance spectroscopy of brain metabolic shifts induced by acute administration of 2-deoxy-D-glucose and lipopolysaccharides. *NMR Biomed*. 2014. V. 27. P. 399–405.
 11. *Dossi E., Vasile F., Rouach N.* Human astrocytes in the diseased brain. *Brain Research Bulletin*. 2018. V. 136. P. 139–156. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.001>
 12. *Li Y., Mei L., Qiang J., et al.* Magnetic Resonance Spectroscopy for Evaluating Portal-Systemic Encephalopathy in Patients with Chronic Hepatic Schistosomiasis Japonicum. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016. V. 12. e0005232. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005232>
 13. *Ублинский М.В., Манжурцев А.В., Меньщиков П.Е., и др.* Мультимодальные исследования головного мозга человека с использованием функциональной магнитно-резонансной томографии и магнитно-резонансной спектроскопии. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2018. Т. 12. № 1. С. 54–60. <https://doi.org/10.25692/ACEN.2018.1.8>
 14. *Aun A.A.K., Mostafa A.A., Aboul Fotouh A.M., et al.* Role of magnetic resonance spectroscopy (MRS) in nonlesional temporal lobe epilepsy. *The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine*. 2016. V. 47. P. 217–231. <https://doi.org/10.1016/j.ejrnm.2015.09.008>
 15. *Павлов Ч.С., Дамулин И.В., Ивашкин В.Т.* Печеночная энцефалопатия: патогенез, клиника, диагностика, терапия *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2016. Т. 26. № 1. С. 44–53. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2016-26-1-44-53>

EFFECT OF SILICON DIOXIDE NANOPARTICLES ON SYRIAN HAMSTERS INFECTED BY *OPISTHORCHIS FELINEUS*: ¹H MRS STUDY OF THE BRAIN

M. N. Lvova^{a, #}, O. B. Shevelev^{a, b}, V. V. Serdobintseva^c, D. V. Kalinin^c, D. A. Starostenko^d,
E. L. Zavjalov^a, A. L. Krivoshapkin^e, Academician of the RAS P. V. Logachev^d,
V. A. Mordvinov^a, and D. F. Avgustinovich^{a, f}

^a The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

^b International Tomography Center, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

^c V.S. Sobolev Institute of Geology and Mineralogy, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

^d Budker Institute of Nuclear Physics, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

^e Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^f Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry, SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

[#]e-mail: lvovamaria@mail.ru

In recent years, silicon dioxide nanoparticles (SiO₂-NPs) have been widely used in medicine and the pharmaceutical industry, however, their effect on the brain has hardly been studied. We assessed the effects of long-term consumption of 5 nm amorphous SiO₂-NPs by Syrian hamsters infected with the trematodes *Opisthorchis felineus* on the hippocampus and frontal cortex. Spectroscopic determination of brain neurometabolites, performed using Magnetic Resonance Imaging at 11.7 Tesla magnetic field, has shown that the ratio of excitatory neurotransmitters (glutamate + glutamine + aspartate) to inhibitory (GABA + glycine) was higher in animals infected with *O. felineus*. However, pre-consumption of the SiO₂-NPs solution prevented this imbalance. In addition, the protective effect of SiO₂-NPs on the level of myo-inositol and glycine was found. It is concluded that the use of SiO₂-NPs can neutralize the negative effects on the brain caused by infectious factors.

Keywords: nanoparticles, amorphous silica, brain, *Opisthorchis felineus*