

РЕДАКЦИЯ ЖУРНАЛА НАЧИНАЕТ ПУБЛИКАЦИЮ МАТЕРИАЛОВ
МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ “**МИКРОЭЛЕМЕНТЫ
В МЕДИЦИНЕ, ВЕТЕРИНАРИИ, ПИТАНИИ: ПЕРСПЕКТИВЫ СОТРУДНИЧЕСТВА И
РАЗВИТИЯ**”, КОТОРАЯ СОСТОИТСЯ 24-26 СЕНТЯБРЯ 2014 ГОДА В г. ОДЕССЕ НА
БАЗЕ УКРАИНСКОГО НИИ МЕДИЦИНЫ ТРАНСПОРТА

Экспериментальные
исследования

The Experimental Researches

УДК 616-008.9

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В ПОЛИМЕРНУЮ МАТРИЦУ

Соседова Л.М., Новиков М.А., Титов Е.А.

*ФГБУ «Восточно-Сибирский научный центр экологии человека» СО РАМН,
Ангарск; sosedlar@mail.ru*

В статье приводятся данные токсикологического исследования влияния нанобиокомпозита серебра на организм белых беспородных крыс в результате перорального введения препарата в течение 9 дней. Исследование включало в себя комплекс токсикологических, гистологических и иммуногистохимических методов, для определения морфологического и функционального состояния ткани головного мозга и печени при воздействии нанобиокомпозита. Установлено, что воздействие данного препарата вызывает статистически значимое снижение общего числа нейронов на единицу площади в опытной группе, по сравнению с контролем, развитие периваскулярного отека. Наряду с этим, воздействие нанобиокомпозита вызывает инициацию процесса апоптоза, заключающегося в увеличении экспрессии проапоптотического белка caspase 3. Показано статистически значимое увеличение числа нейронов с экспрессией данного белка, по сравнению с контрольной группой.

В ткани печени воздействие нанокompозита вызывало возникновение мелкоочагового некроза гепатоцитов, нарушение балочной структуры органа и диapedез элементов крови через сосуды в просвет синусоидов. Мелкоочаговый некроз гепатоцитов, оказывая неблагоприятное влияние на нормальную работу печени, может приводить к усилению интоксикации организма.

Таким образом, установлено, что нанокompозит серебра, инкапсулированный в природную полимерную матрицу арабиногалактана оказывает на ткань головного мозга и печень прямое токсическое действие, а также способствует развитию в нервной ткани процессов апоптоза.

Ключевые слова: *серебро, нанобиокомпозит, головной мозг, печень, апоптоз, caspase 3*

Введение

Использование микрочастиц серебра в медицине имеет богатую и давнюю историю. Ещё знаменитый Авиценна использовал серебро при лечении инфекционных заболеваний. В настоящее время на основе коллоид-

ного серебра выпускаются различные препараты (повиаргол, арговит, аргогель, аргоника, сиал-С, протаргол) с антибактериальным, противовирусным и противогрибковым действием [1]. Они применяются в медицине как антисептические средства при лечении гнойно-

воспалительных и других заболеваний [2]. В настоящее время наночастицы серебра нашли широкое применение в косметической и пищевой промышленности, в различных фильтрах для очистки воды.

Помимо благотворного воздействия на организм, получены данные о том, что серебро способно блокировать тиоловые группы ферментных систем, угнетать тканевое дыхание. При длительном контакте с серебром в производственных условиях этот элемент может накапливаться в печени, почках и слизистых оболочках [3].

Новые перспективы применения серебра в медицине открываются в связи с развитием нанотехнологии, междисциплинарной области науки, которая занимается созданием, производством и применением структур, устройств и систем, размеры и формы которых контролируются в нанометровой области. Однако, по сравнению с серебром макроразмеров, его наночастицы могут потенциально проявлять большую токсичность. Механизм ее развития может быть связан с окислительным стрессом, нарушением функций митохондрий и увеличением проницаемости мембран [4]. В настоящее время, с целью уменьшения токсических эффектов и необходимости адресной доставки наночастицы серебра заключают в матрицы различного происхождения [5]. В частности, в качестве наностабилизирующей матрицы используют природный полимер арабиногалактан, выделяемый из лиственницы сибирской (*Larix sibirica* L.) по оригинальной технологии [6, 7].

В целом, механизм биологического ответа организма на введение наночастиц серебра находится в зависимости от дозы, формы и размера частиц, а также способа экспонирования. В связи с тем, что обычно серебро поступает в организм с водой и пищевыми продуктами, реже – резорбцией через кожу и слизистые оболочки, пероральный

путь введения наночастиц серебра при биомоделировании является наиболее приемлемым.

Целью нашего исследования явилось изучение структуры нервной ткани и печени с оценкой экспрессии проапоптотического белка caspase 3 в нейронах при пероральном введении наночастиц серебра в составе полимерного нанобиокомпозита — нано — Ag – АГ.

Материалы и методы

Нано — Ag – АГ на основе арабиногалактана с серебром синтезирован по методике [8]. Идентичность образца Нано — Ag – АГ подтверждена данными ИК спектроскопии, рентгенофазового анализа, микроскопии, элементного анализа и титриметрии и дополнительно данными ВЭЖХ. Содержание Ag(0) в препарате нано — Ag – АГ 16,7 %. Элементный состав соединения определяли по данным элементного анализа: С 34,26 %; Н 5,39 %; Ag 15,4 %. Данные просвечивающей электронной микроскопии изучаемого образца свидетельствовали о том, что в составе образца содержатся изолированные частицы нуль-валентного серебра в глобулярной форме, размером от 0 до 20 нм с преобладанием (до 81,5 %) в области 4,0-8,9 нм [9].

Экспериментальные исследования проведены на базе Вивария ФГБУ «Восточно-Сибирский научный центр экологии человека» СО РАМН на двадцати четырех половозрелых беспородных белых крыс-самцах, массой от 240 до 280 грамм. Животные содержались в специальном помещении с 12 часовым светлым/тёмным циклом, регулируемой температурой ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) и влажностью, со свободным доступом к чистой водопроводной воде и пище, включающей в себя все необходимые витамины и микроэлементы. Все исследования на животных были проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных,

используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986), а также «Правил лабораторной практики» (приказ Минздравсоцразвития от 23 августа 2010 г. № 708н).

Животным опытной группы ($n = 12$) на протяжении 9 дней вводили внутрижелудочно водный раствор нано — Ag — АГ из расчета 100 мкг серебра на килограмм массы тела в объеме 0,5 мл дистиллированной воды. Контрольная группа получала в эти же сроки эквивалентный объем дистиллированной воды ($n = 12$). На следующий день после окончания воздействия животным была проведена эфтаназия путём декапитации. Головной мозг и печень от каждого исследуемого животного были извлечены и фиксированы в нейтральном буферном растворе формалина (10 %), обезвожены этанолом восходящей концентрации (70, 80, 90, 95 и 100 %) и помещены в гомогенизированную парафиновую среду для гистологических исследований HistoMix (BioVitrum, Россия). Далее приготовленные с помощью микротомы HM 400 (Micom, Германия) срезы толщиной 4-5 мкм окрашивались на обычных гистологических предметных стёклах гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии. Дополнительно для визуализации нервных клеток проводили окраску по Ниссля. Исследование полученных срезов осуществлялось при помощи светооптического исследовательского микроскопа Olympus BX 51 (Япония) с вводом микроизображений в компьютер при помощи камеры Olympus.

Для определения активности проапоптотического белка caspase 3 применяли иммуногистохимический метод. Полученные на микротоме срезы были помещены на полизиновые стёкла (Menzel, Германия) и окрашены на антитела к белку caspase-3 (Monosan, Нидерланды) в соответствии с протоколом, предложенным производителем. Визуализация окрашенных и зафиксированных микропрепаратов осуществ-

лялась на светооптическом исследовательском микроскопе. Анализ полученных фотоматериалов выполнялся при помощи системы Image Scope S. Были выбраны следующие параметры анализа: общее количество нейронов на единицу площади, количество гиперхромных нейронов и количество нормальных нейронов с экспрессией и без экспрессии проапоптотического белка caspase 3. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0» (Statsoft, США). Статистическую значимость различий в независимых выборках определяли по методу Манна – Уитни. Достигнутый уровень значимости признаков – при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

После девятикратного внутрижелудочного введения нано — Ag — АГ в сенсомоторной зоне коры головного мозга белых крыс отмечался выраженный периваскулярный отек сосудов головного мозга, набухание проводящих волокон в подкорковых структурах, расширение сосудов и разрыхление нейропиля.

В целом морфологическое исследование головного мозга лабораторных животных, подвергавшихся воздействию серебросодержащего полимерного нанобиокомпозита, выявило изменения, обычно сопровождающие метаболические сдвиги в структуре клеток и тканей. Вероятно, это связано с развитием компенсаторно-приспособительных реакций, возникающих в ответ на проникновение чужеродного агента через гемато-энцефалический барьер и характерно для перестройки функционального состояния организма на новый устойчивый уровень.

При исследовании гистологических микропрепаратов печени белых крыс, получивших экспозицию нано — Ag — АГ отмечались более значительные изменения: нарушение балочной структуры, проникновение клеток крови

в синусоиды, мелкоочаговый некроз и наличие клеток Купфера в синусоидах, а также чётко выраженный стаз сосудов головного мозга (рис. 1). Обнаружение звездчатых ретикулоэндотелиоцитов, являющихся мононуклеарными макрофагами, чаще всего свидетельствует о нарушении функции печеночной ткани. У животных контрольной группы сравнения ни в одном случае не выявлялись признаки нарушения структуры нервной ткани и ткани печени.

При иммуногистохимическом обследовании нормальных нейронов сенсорной зоны коры головного мозга животных опытной группы было выявлено увеличение доли клеток, экспрессирующих caspase 3 ($p < 0,05$) (табл. 1) (рис. 2). Установлено, что проапоптотический белок caspase 3 располагался строго по периферии клетки, либо компактными группами. Число нормальных клеток без экспрессии caspase 3 в опытной группе и контрольной группе не имело статистического значимого отличия.

Особый интерес представляло изучение числа гиперхромных нейронов с необратимыми структурными изменениями. Количество гиперхромных нейронов с экспрессией caspase 3 в опытной группе статистически значимо отличалось от контрольной группы и составляло соответственно: 2 (1 – 5) и 1,5 (1 – 2) ($p < 0,001$). В гиперхромных нейронах caspase 3 окрашивалась по всей площади клетки, без выраженной локализации. Установлено, что в опытной группе число гиперхромных нейронов, не экспрессирующих caspase 3, превышало количество аналогичных нейронов, но с экспрессией данного белка и было выше, чем в контроле (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что необратимые структурные изменения в нейронах при воздействии наночастиц серебра могут проходить как по типу апоптоза, так и без его признаков.

Морфометрический анализ препаратов головного мозга белых крыс, экспонированных наночастицами серебра, показал снижение общего числа нейронов на единицу площади, по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что наночастицы серебра, инкапсулированные в полимерной матрице распределяются по организму, попадая в печень и через гематоэнцефалический барьер в головной мозг. Вызываемые ими структурные нарушения свидетельствуют об ответ-

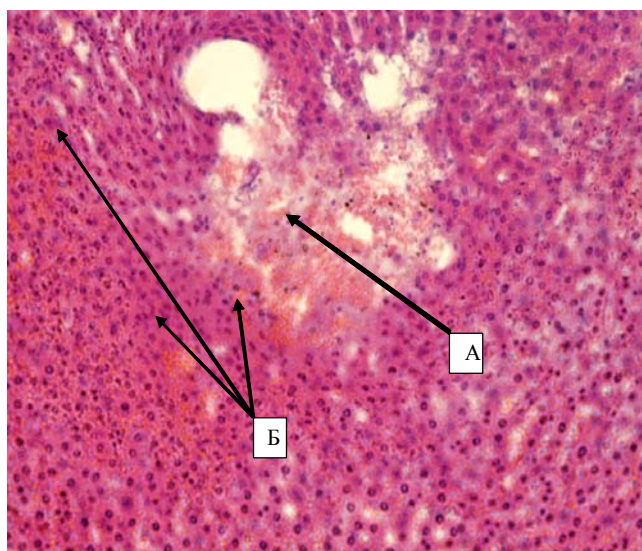


Рис. 1. Печень белой крысы. Арабиногалактан серебра. Некроз (А). Диапедез элементов крови в синусоиды (Б). Окр. гематоксилин-эозин. Ув.Х 400.

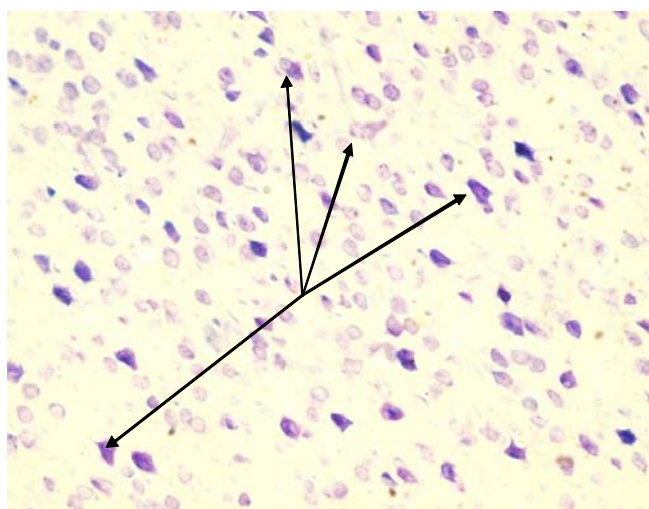


Рис. 2. Экспрессия caspase 3 в ткани головного мозга (↑). Арабиногалактан серебра. Реакция на caspase 3 с подкрашиванием тионином. Ув. Х 400.

ной реакции организма на введение чужеродного вещества и характеризуют перестройку организма на новый функциональный уровень. Однако выявленная готовность клеток головного мозга к апоптозу позволяет сделать предположение о напряжении компенсаторно-приспособительных реакций. Доказательством данного является развитие необратимых структурных изменений нейронов, снижение общего числа нормальных нейронов сенсорной зоны и повышение экспрессии в них проапоптотического белка caspase 3. В дальнейшем возможно замещение нейронов глиальными клетками с развитием глиоза и формирование нейродегенеративного процесса. Аналогичное предположение высказывается группой исследователей из Оренбурга, изучавших действие на организм белых крыс наночастиц меди [10].

Выводы

Воздействие наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу, вызывает структурные и функциональные изменения в ткани головного мозга. Увеличение экспрессии проапоптотического белка caspase 3 в нейронах головного мозга свидетельствует о готовности клеток к программируемой смерти по типу апоптоза.

Литература

1. Иванов В.Н. Некоторые экспериментальные и клинические результаты применения катионов серебра в борьбе с лекарственно-устойчивыми микроорганизмами // Серебро в медицине, биологии и технике: СО РАМН. 1995. №4. С. 53-62.
2. Савадян Э.Ш. Современные тенденции использования серебросодержащих антисептиков // Антибиотики и химиотерапия. 1989. N11. С. 874-878.
3. Элементный статус населения России.

Таблица 1
Показатели экспрессии caspase 3 в нейронах белых крыс при воздействии наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу, Me (Q₂₅ – Q₇₅)

Исследуемый показатель	Группы животных	
	нано — Ag — АГ	Контроль
Гиперхромные нейроны с caspase 3	2,0 (1,0 – 3,0)*	1,5 (1,0 – 2,0)
Гиперхромные нейроны без caspase 3	7,0 (5,0 – 9,0)*	3,5 (3,0 – 4,0)
Нормальные нейроны с caspase 3	10,0 (5,0 – 23,0)*	4,0 (3,0 – 7,0)
Нормальные нейроны без caspase 3	184 (150 – 197)	251 (180 – 313)
Общее число клеток	204 (181 – 219)*	266 (187 – 323))

Примечание:* - различия достоверно значимы по сравнению с контрольной группой (p?0,05).

Часть 1. Общие вопросы и современные методические подходы к оценке элементного статуса индивидуума и популяции / Е.Ю.Бонитенко [и др.]. СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2010. 416 с.

4. Мосин О.В. Физиологическое воздействие наночастиц серебра на организм человека // NanoWeek. 2008. №3. С.34-37.
5. Prozorova G. F. et al. Green synthesis of water-soluble nontoxic polymeric nanocomposites containing silver nanoparticles.// International Journal of Nanomedicine. 2014. 9: 1883-1889..
6. Бабкин В. А. и др. Биомасса лиственницы: от химического состава до инновационных продуктов. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011.
7. Дубровина В.И. и др. Изучение влияния арабиногалактана на протективные свойства YERSINIA PESTIS EV // Сибирь-Восток. 2002. №3. С. 8-9.
8. Грищенко Л.А. Окислительно-восстановительные реакции арабиногалактана с ионами серебра и формирование нанокompозитов // Журнал общей химии. 2006. Т. 76. № 7. С. 1159-1165.
9. Новиков М.А. и др. // Реакция белых крыс при внутрижелудочном введении вновь синтезированного нанобиокompозита на основе Ag(0) и арабиногалактана. Химико-фармацевтический журнал. 2014. Том 48. №5. С.82-86.
10. Сизова Е.А. и др. Наночастицы меди – модуляторы апоптоза и структурных изменений в некоторых органах // Морфология. 2013. №4. С. 47 – 52.

References

1. Ivanov VN Some experimental and clinical results of the use of silver cations in the fight against drug-resistant

- microorganisms // Silver in medicine, biology and engineering: SB RAMS. 1995. №4. S. 53-62.
- 2 Savadyan E.Sh. Modern trends in the use of silver-containing antiseptics // Antibiotics and chemotherapy. 1989. N11. S. 874-878.
 - 3 Elemental status of the Russian population. Part 1: General issues and contemporary methodological approaches to the evaluation of the element status of the individual and population / E.Yu.Bonitenko [et al.]. Petersburg .: Medkniga "ELBI-SPb", 2010. 416 p.
 - 4 Mosin OV Physiological effects of silver nanoparticles on the human body // NanoWeek. 2008. №3. S.34-37.
 5. Prozorova G. F. et al. Green synthesis of water-soluble nontoxic polymeric nanocomposites containing silver nanoparticles .// International Journal of Nanomedicine. 2014 9: 1883-1889 ..
 - 6 Babkin VA et al. Biomass larch: the chemical composition to innovative products. Novosibirsk: Publishing House of SB RAS, 2011.
 - 7 Dubrovin V.I. and others. Studies on the effect of arabinogalactan on the protective properties of YERSINIA PESTIS EV // East Siberia. 2002. №3. S. 8-9.
 - 8 Grishchenko LA Redox reactions arabinogalactan with silver ions and the formation of nanocomposites // Journal of General Chemistry. 2006 T. 76. № 7. S. 1159-1165.
 - 9 Novikov M.A. et al. // white rats under Reaction intragastric nanobiocomposites newly synthesized based on the AG (0) and arabinogalactan. Chemical-fakrmatsevtichesky magazine. 2014 Tom 48. №5. S.82-86.
 - 10 E.A. Sizov et al. copper nanoparticles - modulators of apoptosis and structural changes in certain organs // morphology. 2013. №4. S. 47 - 52.

Резюме

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА, ІНКАПСУЛІРОВНИХ В ПОЛІМЕРНІЙ МАТРИЦІ

Сосєдова Л.М., Новиков М.А., Титов Е.А.

У статті наводяться дані токсикологічного дослідження впливу нанобіокомполіта срібла на організм білих безпородних щурів в результаті перорального введення препарату протягом 9 днів. Дослідження включало в себе комплекс токсикологічних, гістологічних та імуногістохімічних методів, для визначення морфологічного та функціонального стану тканини головного мозку і печінки при впливі нанобіокомполіта. Встановлено, що вплив даного препарату викликає статистично значуще зниження загального числа нейронів на одиницю площі в дослідній групі, в порівнянні з контролем, розвиток периваскулярного набряку. Поряд з цим, вплив нанобіокомполіта викликає ініціацію процесу апоптозу, що полягає у збільшенні експресії проапоптотического білка каспаз 3. Показано статистично значуще збільшення числа нейронів з експресією даного білка, в порівнянні з контрольною групою.

У тканині печінки дію наноконполіту викликало виникнення мелкоочагового некрозу гепатоцитів, порушення балочної структури органу і дипедез елементів крові через судини в просвіт синусоїдів. Дрібновогнищевий некроз гепатоцитів, надаючи несприятливий вплив на нормальну роботу печінки, може призводити до посилення інтоксикації організму.

Таким чином, встановлено, що наноконполіт срібла, інкапсульований у природну полімерну матрицю Арабіногалактан робить на тканину головного мозку і печінку пряму токсичну дію, а також сприяє розвитку в нервовій тканині процесів апоптозу.

Ключові слова: *срібло, нанобіокомполіт, головний мозок, печінка, апоптоз, каспаз 3*

Summary

MORPHO-FUNCTIONAL ASSESSMENT
OF SILVER NANOPARTICLES ACTION
EFFECTS INCAPSULATED IN POLYMER
MATRIX

*Sosedova L.M., Novikov M.A.,
Titov E.A.*

Antiseptic and bacteriostatic properties of silver are known to people for thousands of years and are widely used in medicine since the time of Hippocrates, and Avicenna. At the present stage of paramount importance perspective of drug development to facilitate targeted interaction of silver nanoparticles with living tissues in general, and individual cells in particular. At this point the silver nanoparticles for delivery into tissue using a variety of natural and synthetic polymer matrices. This article examines the toxic properties nanobiocomposites silver encapsulated in a polymer matrix natural arabinogalactan. It was carried out a comprehensive study, which includes standard toxicological, histological and immunohistochemical studies. Exposure was performed by oral administration of nanobiocomposites to white rats for 9 days. Animals were removed from the experiment by decapitation. Histological analysis of brain preparations showed that the effect of silver nanoparticles leads to the development of brain tissue disease process characterized by the occurrence of perivascular edema, resulting in impaired hemodynamics tissue swelling of brain membranes and the conductive fibers in the subcortical structures, as well as loosening of the neuropil.

This structural damage is indicate the voltage of compensatory-adaptive reactions in response to the study drug on brain tissue. Also by immunohistochemistry was found in the initiation and

development of tissue processes of programmed cell death (apoptosis), which was reflected in the increase in the number of neurons with the expression of pro-apoptotic protein in them caspase 3. This protein is the ultimate derivative cascade of caspase activation and evidence of the development processes in the cell apoptosis. Revealed the presence in tissue hyperchromic neurons expressing caspase without expression indicates that at a given impact neuronal death is apoptosis both in type and necrosis. In liver tissue exposure of nanocomposite causes a fine focal necrosis of hepatocytes, the violation of the beam structure of the organ and diapedesis of blood through the vessels into the lumen of sinusoids. Fine focal hepatocyte necrosis, adversely affecting the normal functioning of the liver may lead to enhancement of intoxication. Thus, this study suggests that silver nanocomposite encapsulated in arabinogalactan polymer matrix penetrates the blood-brain barrier, causing a loss of brain tissue. Due to hemodynamic tissue may cause metabolic disturbances, contributing to the pathologic process, which are a manifestation of structural abnormalities and increased apoptosis.

Key words: silver, nanobiocomposite, brain, apoptos, hepatic. caspase 3.

*Впервые поступила в редакцию 30.05.2014 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*