

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В ПОЛИМЕРНУЮ МАТРИЦУ

Л.М. Соседова*, М.А. Новиков, Е.А. Тутов

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

РЕЗЮМЕ. 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 нанобиокомпозита 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. Установлено, что нанобиокомпозит 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 коллоидного серебра выпускаются различные препараты (повиаргол, арговит, аргогель, аргоника, сиал-С, протаргол) с антибактериальным, противовирусным и противогрибковым действием (Иванов и др., 1995). Они применяются в медицине как антисептические средства при лечении гнойно-воспалительных и других заболеваний (Савадян, 1989). 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 (Афтанас, 2010).

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 (Мосин, 2008). В настоящее время с целью уменьшения токсических эффектов и необходимости адресной доставки наночастицы серебра включают в матрицы различного происхождения (Prozogova et al., 2014). В частности, в качестве наностабилизирующей матрицы используют природный полимер арабиногалактан, выделяемый из лиственницы сибирской (*Larix sibirica L.*) по оригинальной технологии (Дубровина и др., 2002; Бабкин и др., 2011).

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

* Адрес для переписки:

Соседова Лариса Михайловна
E-mail: sosedlar@mail.ru

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.

Цель нашего исследования – 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–AG.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нано-Ag–AG на основе арабиногалактана с серебром синтезирован по методике (Грищенко, 2006). Идентичность образца Нано-Ag–AG подтверждена данными ИК-спектроскопии, рентгенофазового анализа, микроскопии, элементного анализа и титриметрии, а также дополнительно данными ВЭЖХ. Содержание Ag(0) в препарате нано-Ag–AG – 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 нульвалентного серебра в глобулярной форме, размером от 0 до 20 нм с преобладанием (до 81,5%) в области 4,0–8,9 нм (Новиков и др., 2014).

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 г. 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 Минздрава России от 23 августа 2010 г. № 708н).

Животным опытной группы ($n = 12$) на протяжении 9 дней вводили внутривенно водный раствор нано-Ag–AG 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 пара-

финовую среду для гистологических исследований HistoMix («BioVitrum», Россия). Далее приготовленные с помощью микротомы HM 400 («Mettler», 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 Нисслю. Исследование полученных срезов осуществлялось при помощи светоптического 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 осуществлялась на светоптическом 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 внутривенного введения нано-Ag–AG в сенсомоторной зоне коры головного мозга белых крыс отмечался выраженный периваскулярный отек сосудов головного мозга, набухание проводящих волокон в подкорковых структурах, расширение сосудов и разрывление нейропилия.

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–AG отмечались более значительные изменения: нарушение балочной структуры,

проникновение клеток крови в синусоиды, мелкоочаговый некроз и наличие клеток Купфера в синусоидах, а также четко 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 сенсомоторной зоны коры головного мозга животных опытной группы было выявлено увеличение доли клеток, экспрессирующих caspase 3 ($p \leq 0,05$) (таблица, 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) ($p \leq 0,001$). 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 (таблица). 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.

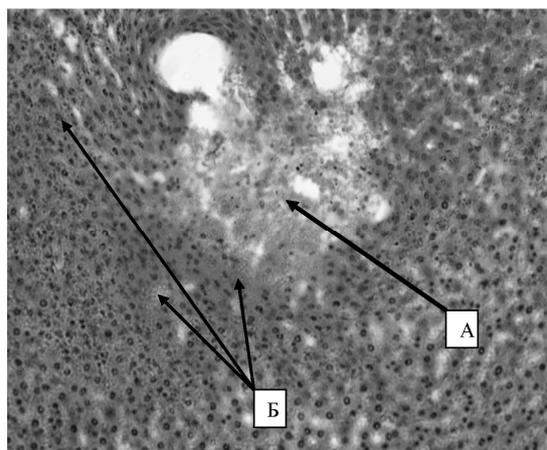


Рис. 1. Печень белой крысы. Арабиногалактан серебра. Некроз (А). Диapedез элементов крови в синусоиды (Б). Окр. гематоксилин-эозин. Ув. $\times 400$

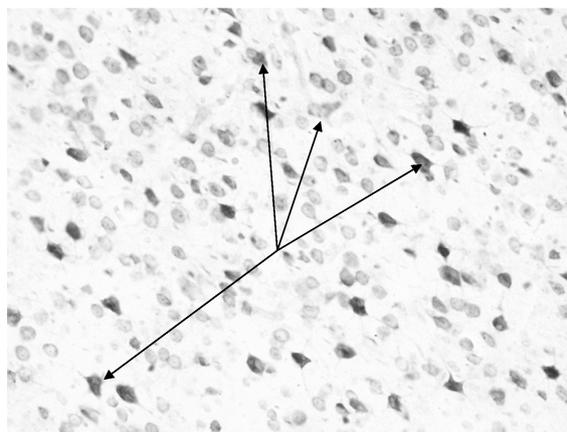


Рис. 2. Экспрессия caspase 3 в ткани головного мозга (↑). Арабиногалактан серебра. Реакция на caspase 3 с подкрашиванием тионином. Ув. $\times 400$

Таблица. Показатели экспрессии caspase 3 в нейронах белых крыс при воздействии наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу, Me ($Q_{25} - Q_{75}$)

| 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 ($p \leq 0,05$).

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 ответной 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 сенсомоторной 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 (Сизова и др., 2013).

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

Афтанас Л.И., Бонитенко Е.Ю., Вареник В.И., Грабеллис А.Р., Киселев М.Ф., Лакарова Е.В., Нечипоренко С.П., Николаев В.А., Скальный А.В., Скальная М.Г. Элементный статус населения России. Ч. 1. Общие вопросы и современные методические подходы к оценке элементного статуса индивидуума и популяции. СПб.: Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2010. 416 с.

Бабкин В.А., Остроухова Л.А., Трофимова Н.Н. Биомасса лиственницы: от химического состава до ин-

новационных продуктов. Новосибирск: СО РАН, 2011. 236 с.

Грищенко Л.А. Окислительно-восстановительные реакции арабиногалактана с ионами серебра и формирование нанокompозитов // Журнал общей химии. 2006. Т. 76. № 7. С. 1159–1165.

Дубровина В.И., Голубинский Е.П., Иванова, Т.А., Загоскина, Т.Ю., Медведева, С.А., Александрова, Г.П. Изучение влияния арабиногалактана на протективные свойства YERSINIA PESTIS EV // Сибирь-Восток. 2002. № 3. С. 8-9.

Иванов В.Н., Ларионов Г.М., Кулиш Н.И., Лутцева М.А. Некоторые экспериментальные и клинические результаты применения катионов серебра в борьбе с лекарственно-устойчивыми микроорганизмами // Препринт №4 «Серебро в медицине и технике». Новосибирск: СО РАМН, 1995. С. 53–62.

Мосин О.В. Физиологическое воздействие наночастиц серебра на организм человека // NanoWeek. 2008. № 3. С. 34–37.

Новиков М.А., Титов Е.А., Соседова Л.М., Остроухова Л. А., Трофимова Н.Н., Бабкин В.А. Реакция белых крыс при внутрижелудочном введении вновь синтезированного нанобиокompозита на основе Ag(0) и арабиногалактана // Химико-фармацевтический журнал. 2014. Т. 48. № 5. С. 82–86.

Савадян Э.Ш. Мельникова В.М., Беликова Г.П. Современные тенденции использования серебросодержащих антисептиков // Антибиотики и химиотерапия. 1989. № 11. С. 874–878

Сизова Е.А., Мирошников С.А., Полякова В.С., Лебедев С.В., Глуценко Н.Н. Наночастицы меди – модуляторы апоптоза и структурных изменений в некоторых органах // Морфология. 2013. № 4. С. 47–52.

Prozorova G.F., Pozdnyakov A.S., Kuznetsova N.P., Korzhova S.A., Emel'yanov A.I., Ermakova T.G., Fadeeva T.V., Sosedova L.M. Green synthesis of water-soluble nontoxic polymeric nanocomposites containing silver nanoparticles // International Journal of Nanomedicine. 2014, 9:1883–1889.

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

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

East-Siberian Scientific Center of Human Ecology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, 12a-Microdistrict, 3, Angarsk, 665827, Russia; e-mail: sosedlar@mail.ru

ABSTRACT. 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 time, of paramount importance are the prospects of drug development to facilitate targeted interaction of silver nanoparticles with living tissues in general and individual cells in particular. For the delivery of silver nanoparticles into tissues a variety of natural and synthetic polymer matrices are used. This article studies the toxic properties of nanobiocomposite of silver encapsulated in a polymer matrix of natural arabinogalactan. It was carried out a comprehensive study, which includes standard toxicological, histological and immunohistochemical investiga-

tions. The exposure was performed by oral administration of the nanobiocomposite to white rats for 9 days. Then the animals were sacrificed by decapitation. Histological analysis of brain preparations showed that the effect of silver nanoparticles leads to the development of disease process in brain tissue characterized by the occurrence of perivascular edema, resulting in impaired hemodynamics, swelling of membranes and conductive fibers in the subcortical structures, loosening of the neuropil.

This structural damage indicates the strain of compensatory-adaptive reactions in brain tissue in response to the drug. Also, immunohistochemical investigations were revealed the initiation and development of programmed cell death (apoptosis) in the tissues, which was reflected in increase in the number of neurons with expression of the pro-apoptotic protein caspase 3 in them. This protein is the ultimate derivative of caspase activation cascade and an evidence of the apoptosis development in the cell. The revealed presence of hyperchromic neurons with and without caspase expression in the tissues indicates that at a given impact the neuronal death is occurred by both apoptosis and necrosis. In liver tissue, exposure to the nanocomposite caused piecemeal necrosis of hepatocytes, the violation of the beam structure of the organ and diapedesis of blood through the vessels into the lumen of sinusoids. Piecemeal 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 and contributing to the pathologic processes related to structural abnormalities and increased apoptosis.

KEYWORDS: silver, nanobiocomposite, brain, apoptosis, hepatic, caspase 3.

REFERENCES

Aftanas L.I., Bonitenko E.Yu., Varenik V.I., Grabeklis A.R., Kiselev M.F., Lakarova E.V., Nechiporenko S.P., Nikolaev V.A., Skalny A.V., Skalnaya M.G. [Elemental status of the population of Russia. Part 1. General questions and modern methodological approaches to assessing the elemental status of an individual and population]. Saint Petersburg: Medkniga ELBI-SPb, 2010 (in Russ).

Babkin V.A., Ostroukhova L.A., Trofimova N.N. [Larch biomass: from chemical composition to innovative products]. Novosibirsk: SO RAN, 2011(in Russ).

Grishchenko L.A. // Zhurnal obshchey khimii. 2006, 76(7):1159–1165 (in Russ).

Dubrovina V.I., Golubinskiy E.P., Ivanova, T.A., Zagoskina, T.Yu., Medvedeva, S.A., Aleksandrova, G.P. // Sibir'-Vostok. 2002, 3:8–9 (in Russ).

Ivanov V.N., Larionov G.M., Kulish N.I., Lutseva M.A. // Preprint №4 «Srebro v meditsine i tekhnike». Novosibirsk: SO RAMN, 1995:53–62 (in Russ).

Mosin O.V. // NanoWeek. 2008, 3:34–37 (in Russ).

Novikov M.A., Titov E.A., Sosedova L.M., Ostroukhova L.A., Trofimova N.N., Babkin V.A. // Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal. 2014, 48(5):82–86 (in Russ).

Savadyan E.Sh. Melnikova V.M., Belikova G.P. // Antibiotiki i khimioterapiya. 1989, 11:874–878 (in Russ).

Sizova E.A., Miroshnikov S.A., Polyakova V.S., Lebedev S.V., Glushchenko N.N. // Morfologiya. 2013, 4:47–52 (in Russ).

Prozorova G.F., Pozdnyakov A.S., Kuznetsova N.P., Korzhova S.A., Emelyanov A.I., Ermakova T.G., Fadeeva T.V., Sosedova L.M. // International Journal of Nanomedicine. 2014, 9:1883–1889.