

УДК 613:612.014.46.084

Рукавишников В.С., Соседова Л.М., Вокина В.А., Титов Е.А., Новиков М.А., Якимова Н.А.

ОЦЕНКА НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ НАНОМЕТАЛЛОВ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ НА МАТРИЦЕ АРАБИНОГАЛАКТАН

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 12а м/р, 3, г. Ангарск, РФ, 665827

Представлены результаты исследования токсичности наночастиц металлов висмута (Bi) и серебра (Ag), инкапсулированных в природную биополимерную матрицу арабиногалактан (АГ), перспективных антимикробных соединений, соответственно Bi-АГ и Ag-АГ. Подострая токсичность изучалась внутрижелудочным (Ag-АГ) и внутрибрюшинным (Bi-АГ) введением Ag или Bi в течение 9 дней из расчета 500 мкг/кг массы тела. Для исследования биологического ответа организма на субклеточном уровне применялся иммуногистохимический метод определения активности белков — модуляторов апоптоза bcl-2 и caspase-3 в нейронах головного мозга белых крыс. В подостром эксперименте, несмотря на одинаковую матрицу — АГ, ответная реакция организма имела свои особенности в зависимости от инкапсулированных в матрицу наночастиц металлов. При поступлении в организм Ag-АГ выявлены готовность клеток головного мозга к апоптозу, развитие необратимых структурных изменений ткани головного мозга, снижение общего числа нормальных нейронов сенсомоторной зоны и повышение экспрессии в них проапоптотического белка caspase 3. Воздействие Bi-АГ не вызывало нарастания процесса программируемой клеточной смерти и структурных нарушений нервной ткани. При изучении биологических свойств нанобиокомпозиатов следует оценивать ответную реакцию организма на клеточном и внутриклеточном уровне.

Ключевые слова: гистология; иммуногистохимия; арабиногалактан; наночастицы; серебро; висмут; апоптоз; крысы; головной мозг

Rukavishnikov V.S., Sosodova L.M., Vokina V.A., Titov E.A., Novikov M.A., Yakimova N.L. **Evaluating neurotoxicity of nanometals incorporated on arabinogalactan matrix.** East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, 3, 12a m/r, Angarsk, Russian Federation, 665827

The authors present results of studied nanoparticles toxicity of metals — bismuth (Bi) and silver (Ag) incorporated into natural biopolymer arabinogalactan matrix (AG), prospective antimicrobial compounds Bi-AG and Ag-AG respectively. Subacute toxicity was studied via intragastric (Ag-AG) and intraperitoneal (Bi-AG) injection of Ag and Bi during 9 days in dose of 500 mg/kg of body weight. To study biologic response on subcellular level, the authors used immune histochemical method determining activity of proteins-modulators of apoptosis bcl-2 and caspase-3 in white rats brain neurons. In subacute experiment, despite the same matrix — AG, the body response differed in accordance with metals nanoparticles incorporated into the matrix. Injected Ag-AG caused brain cells readiness to apoptosis, irreversible structural changes in brain tissues, lower number of normal neurons in sensory area and increased expression of proapoptosis protein caspase 3 in them. Action of Bi-AG caused no increase of programmed cell death process and structural disorders of neural tissue. When biologic properties of nanobiocomposites studied, one should estimate bodily response on cellular and subcellular level.

Key words: histology; immune histochemistry; arabinogalactan; nanoparticles; silver; bismuth; apoptosis; rats; brain

Актуальной задачей современной токсикологии является поиск новых и усовершенствование или модификация существующих критериев оценки безопасности (токсичности) лекарственных и диагностических препаратов. Одним из перспективных подходов, позволяющих решать данные вопросы, является создание инновационных наноструктурированных препаратов с использованием функциональных биосовместимых полимеров. АГ — полимер, выделяемый из лиственницы сибирской, имеющий разветвленное строение с молекулярной массой 40 кДа, широко используется для наноструктурирования в поиске перспективных лекарственных средств. Его способность растворяться в воде, а также выступать в качестве стабилизирующей

матрицы для наночастиц металлов обуславливают его перспективность для создания нанобиополимеров с медицинскими и диагностическими свойствами.

Биогенные элементы Ag и Bi имеют большое значение для клеточной организации тканей и систем живых организмов. Наряду с этим поступление указанных металлов в организм извне широко используется в лечебных и диагностических целях. Борьбу с инфекционными заболеваниями усложняет распространение штаммов микроорганизмов, резистентных к действию антибиотиков. Низкая адаптация микроорганизмов к Ag обуславливает возрастание внимания исследователей к указанному металлу. Широкий спектр антимикробной активности Ag определяется

способностью ионов подавлять активность клеточных ферментов. В свою очередь Bi, являясь самым тяжелым нерадиоактивным элементом таблицы Менделеева, также обладает антимикробной активностью, кроме этого известно использование его в качестве противоязвенного средства и рентгенопозитивного контраста.

Перспективным для создания нанобиокомпозитов представляется синтез композита, содержащего АГ, с наночастицами Ag или Bi. Установлено, что полимер АГ, являясь иммуномодулятором и гепатопротектором, не обладает токсичностью [3]. В доступной литературе не встречается описание нейротоксичных свойств нанобиокомпозитов Ag и Bi, инкапсулированных на матрице АГ. Актуальным и своевременным является изучение возможности указанных нанобиокомпозитов воздействовать на ткань головного мозга, так как их эффективное применение невозможно без предварительной оценки безопасности и уточнения токсичных свойств.

Цель исследования — оценка биологического ответа ткани головного мозга на воздействие нано-Ag и нано-Bi, инкапсулированных на матрице арабиногалактан.

Материал и методы. Природный наностабилизирующий полисахарид АГ представляет собой водорастворимый белый или кремовый порошок, без вкуса и запаха, состоящий из двух моносахаридов: галактозы и арабинозы. Общий подход к синтезу нанобиокомпозитов заключается в восстановлении растворенных в воде прекурсоров наночастиц в присутствии макромолекулы АГ, которые являются эффективными ловушками образующихся наночастиц химических элементов [6]. Синтезированный на его основе нанобиокомпозит Ag-AГ, по результатам исследований физико-химических параметров, содержит наночастицы Ag в нульвалентном состоянии, сферической формы с преобладающим размером 4–8 нм [1]. Содержание Ag в образце составляет 3,1%. Наночастицы Bi сферической формы в арабиногалактановой матрице (Bi-AГ) также присутствуют в нульвалентном состоянии. Содержание Bi в образце составляет 3,1%.

Экспериментальные исследования проведены на половозрелых беспородных белых крысах-самцах ($n=40$) массой от 180 до 240 граммов. Животные распределялись случайным образом по 10 особей в группе. Особи содержались в специальном помещении с 12 часовым светлым/темным циклом, регулируемой температурой ($22\pm 3^\circ\text{C}$) и влажностью (60–65%), 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 требованиями «Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ВОЗ, Женева, 1985).

Путь введения нанобиокомпозитов определялся предполагаемым способом их применения при выполнении лечебных и диагностических процедур у людей:

Ag-AГ предназначен для перорального употребления, а Bi-AГ для парентерального введения в качестве контрастного вещества. Ag-AГ суспендировали в дистиллированной воде и вводили белым крысам 1 группы внутривентрикулярно с помощью атравматичного металлического зонда из расчета 500 мкг Ag на килограмм массы тела в объеме 0,5 мл дистиллированной воды в течение 9 дней натошак. Кормление животных осуществлялось через 3 часа после введения веществ. Животным 2 группы раствор наночастиц Bi-AГ вводился внутривентрикулярно в течение 9 дней в дозе 500 мкг Bi на килограмм массы тела в объеме 0,5 мл дистиллированной воды. Особи соответствующих контрольных групп (гр. 3 и 4) получали в эти же сроки эквивалентный объем дистиллированной воды. На следующий день после окончания воздействия животным была проведена эвтаназия путем декапитации.

Гистологические и иммуногистохимические исследования выполнялись согласно стандартной методике [4]. Иммуногистохимический анализ осуществлялся согласно протоколу, предложенному производителем реактивов для иммуногистохимических исследований (Thermo Scientific, США), определялась экспрессия проапоптотического белка caspase 3 и антиапоптотического белка bcl-2. Caspase 3 является конечным продуктом каскада каспазных реакций и свидетельствует о возникновении в клетке процессов апоптоза. Bcl-2 является протекторным белком, участвующим в регуляции процессов апоптоза. Исследование полученных срезов осуществлялось с помощью светового исследовательского микроскопа Olympus BX 51 (Япония) с вводом микроизображений в компьютер при помощи камеры Olympus E420. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Statistica 6.1 for Windows (лиц. № AXXR004E642326FA) с использованием критерия Манна-Уитни с уровнем значимости различий между группами $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ результатов морфологического обследования ткани головного мозга выявил различный характер нейротоксических эффектов изучаемых инновационных полимерных нанобиокомпозитов. Результаты морфологического исследования нервной ткани животных, получивших Ag-AГ, свидетельствовали о существенных изменениях; наблюдалось увеличение количества темных нейронов, расширение периваскулярных пространств, нейронофагию, набухание миоцитов и эндотелиоцитов сосудов, утолщение стенки артерий (рис. 1).

Морфологический анализ нервной ткани при воздействии Bi-AГ показал наличие процессов нейронофагии. Однако значимых различий в числе процессов нейронофагии от аналогичных показателей контрольной группы не отмечено. Кроме того, у опытных животных наблюдался периваскулярный отек сосудов. Указанные изменения могут рассматриваться как компенсаторные реакции организма и носят обратимый

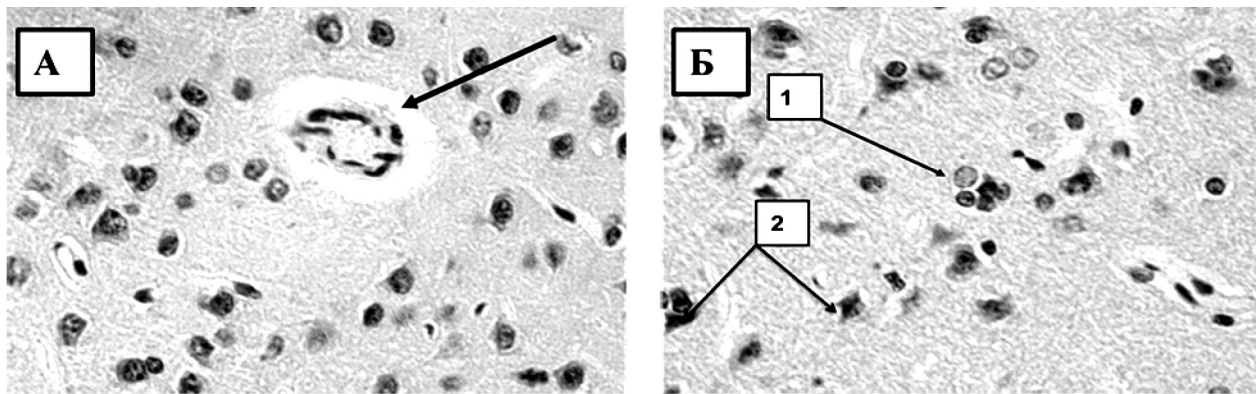


Рис. 1. Теменно-височная доля коры головного мозга белой крысы при воздействии нанобиокомпозита Ag-АГ. А) Расширение периваскулярных пространств, утолщение стенки артерии, разрыхление миоцитов, набухание эндотелиоцитов (стрелка); Б) 1 — нейтрофагия, 2 — темные нейроны. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. $\times 400$

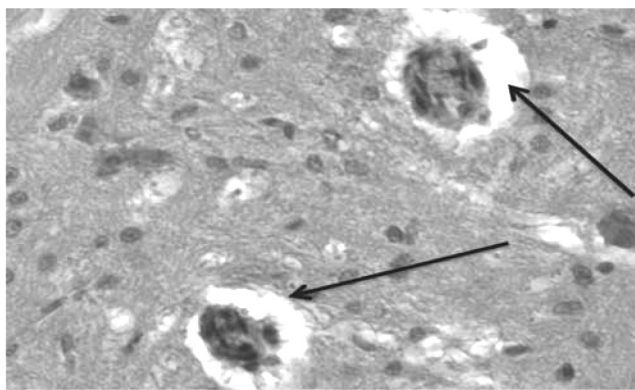


Рис. 2. Теменно-височная доля коры головного мозга белой крысы при воздействии нанобиокомпозита Bi-АГ. Периваскулярный отек сосудов головного мозга, разрыхление миоцитов сосудистой стенки ($\uparrow$). Окраска гематоксилин-эозин. Ув. $\times 400$

характер (рис. 2). У контрольных особей изменений в ткани головного мозга не выявлено.

Оценка биологического ответа организма на субклеточном уровне проводилась по результатам определения активности белков-модуляторов апоптоза — bcl-2, caspase-3 в нейронах головного мозга белых крыс. При введении Ag-АГ происходило статистически значимое, по сравнению с контролем, увеличение процентного содержания темных нейронов (табл. 1). Одновременно с этим наблюдалось достоверное увеличение количества нормальных иммунопозитивных клеток и, соответственно, снижение нормальных иммунонегативных клеток. Полученные результаты указывают на активацию экспрессии апоптоз-ингибирующего белкового фактора и мобилизацию защитных механизмов, препятствующих развитию апоптоза. При исследовании экспрессии эффекторного белка caspase-3, активирующего процесс апоптоза, выявлено изменение содержания практически всех типов исследуемых клеток (табл. 1). Наблюдалось сокращение на единицу площади количества нормальных неизмененных клеток без экспрессии проапоптотического

белка caspase-3. В то время как число темных и нормальных клеток, экспрессирующих caspase-3, значительно возросло.

Сопоставление результатов морфологического исследования нервной ткани с данными экспрессии белков caspase-3 и bcl-2 позволяет сделать заключение о способности нано-Ag, инкапсулированного в полимерную матрицу АГ, индуцировать в нейронах коры головного мозга запуск апоптотического каскада.

Результаты иммуногистохимического исследования ткани головного мозга белых крыс при введении нанобиокомпозита Bi-АГ в дозе 500 мкг/кг показали, что подострое воздействие при внутрибрюшинном поступлении не оказывает влияния на активность про/антиапоптотических белков (табл. 2). Показатели экспрессии про/антиапоптотических белков при поступлении исследуемого нанобиокомпозита не имели статистически значимых отличий с группой контроля. Следовательно, парентеральное воздействие Bi-АГ на организм белых крыс не вызывает нарастания процесса программируемой клеточной смерти (апоптоза) по сравнению с контрольными животными.

Таким образом, несмотря на то, что оба нанобиокомпозита относятся к классу малоопасных веществ, имеют одинаковую матрицу — АГ, в подостром эксперименте, ответная реакция организма имела свои особенности в зависимости от инкапсулированных в матрицу наночастиц металлов. Выявленная при поступлении в организм Ag-АГ готовность клеток головного мозга к апоптозу позволяет сделать предположение о напряжении компенсаторно-приспособительных реакций. Доказательством является развитие необратимых структурных изменений ткани головного мозга, снижение общего числа нормальных нейронов сенсомоторной зоны и повышение экспрессии в них проапоптотического белка caspase 3. Учитывая, что при введении Ag-АГ возрастает число темных клеток с необратимыми структурными изменениями, можно заключить, что один из возможных механизмов гибели клеток обусловлен запуском программы апоптоза. Высокий уровень экспрессии белка bcl-2 в нейронах коры головного мозга имеет важное значение для пре-

Таблица 1

Экспрессия белков-модуляторов апоптоза в нейронах белых крыс при воздействии Ag-АГ, % от общего количества клеток в 0,2 мм² (Ме(Q25 — Q75); n=10)

Группа	Тип нейронов		
	темные клетки	нормальные иммунопозитивные клетки	нормальные иммунонегативные клетки
Экспрессия белка bcl-2			
Контроль	2,01(1–86–2,19)	2,07(1,55–2,19)	95,92(94,99–97,33)
Ag-АГ	4,81(3,83–5,45)*	6,20(4,91–6,57)*	88,99(85,45–97,89)*
Экспрессия белка caspase-3			
Контроль	2,56(1,79–2,74)	1,93(1,77–2,09)	95,51(94,61–95,67)
Ag-АГ	6,58(5,88–8,55)*	5,10(3,18–8,24)*	88,32(84,57–90,20)*

Примечания: * — различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна-Уитни.

Таблица 2

Экспрессия белков-модуляторов апоптоза в нейронах белых крыс при воздействии Bi-АГ, % от общего количества клеток в 0,2 мм² (Ме(Q25 — Q75); n=10)

Группа животных	Тип нейронов		
	темные клетки	нормальные иммунопозитивные клетки	нормальные иммунонегативные клетки
Экспрессия белка bcl-2			
Контроль	1,60(0,00–4,50)	27,80(10,50–59,00)	65,90(41,00–89,50)
Bi-АГ	1,90(0,00–2,50)	27,00(15,00–43,20)	71,20(56,80–82,50)
Экспрессия белка caspase-3			
Контроль	4,50(3,30–5,90)	36,40(18,60–44,40)	59,40(50,00–72,10)
Bi-АГ	4,30(2,90–11,50)	27,10(20,60–41,70)	68,80(50,00–74,40)

дотвращения указанного процесса, но активности антиапоптотического белка не хватает для формирования внутриклеточных защитных механизмов.

Способность молекул Ag блокировать тиоловые группы структурных белков и ферментных систем, участвующих в регуляции мембранной проницаемости [7], высвобождение из митохондрий цитохрома C и активация проапоптотического белка caspase 3 относятся к числу пусковых реакций биохимического механизма, приводящего к программированной смерти клетки, развивающейся по митохондриальному пути [2,5,8]. В дальнейшем снижение количества нейронов на единицу площади может приводить к замещению их глиальными клетками с развитием глиоза и формированием нейродегенеративного процесса.

В то время как введение в организм наночастиц Bi в той же дозе и на той же матрице — АГ — не приводило к каким-либо морфо-функциональным изменениям нервной ткани.

Выводы:

1. Воздействие Ag-АГ вызывает морфологические изменения сенсомоторной коры головного мозга белых крыс, характеризующиеся развитием сосудистых нарушений (расширением периваскулярных пространств, утолщением стенки артерии, разрыхлением миоцитов, набуханием эндотелиоцитов), а также увеличением количества темных нейронов, что свидетельствует о необратимости процесса клеточной гибели.

2. Следствием воздействия наночастиц серебра, инкапсулированных в матрицу АГ, является увеличе-

ние экспрессии регуляторных белков апоптоза bcl-2 и caspase-3 в нейронах, что свидетельствует о развитии процесса апоптоза в клетках сенсо-моторной коры головного мозга белых крыс.

3. Введение наночастиц Bi, инкапсулированных в природную матрицу АГ, приводит к развитию периваскулярного отека и нарушению структуры сосудистой стенки, при этом количество погибших нейронов и экспрессия про/антиапоптотических белков не имеют отличий от контрольных значений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганенко Т.В., Костыро Я.А., Сухов Б.Г. [и др.] Наноконкомпозит серебра на основе сульфатированного арабиногалактана, обладающий антимикробной и антитромботической активностью, и способ его получения // Изобретения. Полезные модели. Офиц. бюл. Федеральной службы по интеллектуальной собственности. — № 27. — 2012. — 27.09.2012, изобретение № 2462254. — 8 с.
2. Григорьев М.Ю., Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Апоптоз в норме и патологии // Мед. академич. ж-л. — 2003. — Т. 3. — № 3. — С. 3–11.
3. Джиоев Ю.П., Юринова Г.В., Сухов Б.Г. [и др.] Гемиделлозы и их нанобиоконкомпозиты — перспективные наноструктурированные синбиотики // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. — 2012. — № 5 (87). — С. 210–212.
4. Коржевский, Д.Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов. — СПб.: Кроф, 2005. — 48 с.

5. Нагорнев В.А., Восканьянц А.Н. Апоптоз и его роль в атерогенезе // Мед. академич. ж-л. — 2003. — Т. 3. — № 4. — С. 3–18.

6. Новиков М.А., Титов Е.А., Соседова Л.М. [и др.] Реакция белых крыс при внутрижелудочном введении вновь синтезированного нанобиокомпозита на основе частиц Ag(0) и арабиногалактана // Химико-фармацевтич. ж-л. — 2014. — Т. 48. — № 6. — С. 33–36.

7. Оксегендлер Г.И. Яды и противоядия. — Л.: Наука, 1982. — 192 с.

8. Сизова Е.А., Мирошников С.А., Полякова В.С. [и др.] Наночастицы меди — модуляторы апоптоза и структурных изменений в некоторых органах // Морфология. — 2013. — Т. 144. — № 4. — С. 47–52.

REFERENCES

1. Ganenko TV, Kostyrov Ya.A., Sukhov B.G., et al. Nanocomposite of silver based on sulphated arabinogalactan with antimicrobial and anti-thrombotic activity, method of production. Izobreteniya. Poleznye modeli // Ofitsial'nyy byull. Federal'noy sluzhby po intellektual'noy sobstvennosti. — 27. — 2012. — 27.09.2012, invention № 2462254; 8 p (in Russian).

2. Grigor'ev M.Yu., Imyaninov E.N., Khanson K.P. Apoptosis in norma and disease // Meditsinskiy akademicheskij J. — 2003. — Vol 3. — 3. — H/ 3–11 (in Russian)/

3. Dzhiyev Yu.P., Yurinova G.V., Sukhov B.G., et al. Hemicellulose and its nanobiocomposites — prospective nanostructured synbiotics // Byull/ VSNTs SO RAMN. — 2012. — 5 (87). — H/ 210–212 (in Russian)/

4. Korzhevskiy, D.E. Brief histologic technique basics for doctors and histology laboratorians. — St-Petersburg: Krof, 2005. — 48 p/ (in Russian)/

5. Nagornev V.A., Voskan'yants A.N. Apoptosis and its role in atherogenesis // Meditsinskiy akademicheskij J. — 2003. — Vol. 3. — 4. — H/ 3–18 (in Russian)/

6. Novikov M.A., Titov E.A., Sosedova L.M., et al. Reaction of white rats when intragastric injection of newly synthesized nanobiocomposite based on Ag (0) and arabinogalactan particles Khimiko-farmatsevticheskiy J. — 2014. — Vol. 48. — 6. — P. 33–36 (in Russian).

7. Oksegendler G.I. Poisons and antidotes. — Leningrad: Nauka, 1982. — 192 p. (in Russian).

8. Sizova E.A., Miroshnikov S.A., Polyakova V.S., et al. Copper nanoparticles — modulators of apoptosis and structural changes in some organs // Morfologiya. — 2013. — Vol 144. — 4. — P. 47–52 (in Russian).

Поступила 9.08.2017

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Рукавишников Виктор Степанович (Rukavishnikov V.S.), гл. науч. сотр. ФГБНУ ВСИМЭИ, член-корр. РАН, д-р мед. наук, проф. E-mail: rvs_2010@mail.ru.

Соседова Лариса Михайловна (Sosedova L.M.), зав. лаб. биомоделирования и трансляционной мед. ФГБНУ ВСИМЭИ, д-р мед. наук, проф. E-mail: sosedlar@mail.ru.

Вокина Вера Александровна (Vokina V.A.), науч. сотр. лаб. биомоделирования и трансляционной мед. ФГБНУ ВСИМЭИ, канд. биол. наук. E-mail: vokina.vera@gmail.com.

Титов Евгений Алексеевич (Titov E.A.), ст. науч. сотр. лаб. биомоделирования и трансляционной мед. ФГБНУ ВСИМЭИ, канд. биол. наук. E-mail: g57097@yandex.ru.

Новиков Михаил Александрович (Novikov M.A.), мл. науч. сотр. лаб. биомоделирования и трансляционной мед. ФГБНУ ВСИМЭИ. E-mail: novik-imt@mail.ru.

Якимова Наталья Леонидовна (Yakimova N.L.), ст. науч. сотр. лаб. биомоделирования и трансляционной мед. ФГБНУ ВСИМЭИ, канд. биол. наук. E-mail: ynl-77@list.ru.

УДК 613.693:616-057

Панков В.А.^{1,2}, Кулешова М.В.¹, Шаяхметов С.Ф.^{1,2}, Лахман О.А.^{1,2}, Бочкин Г.В.¹

ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА УСЛОВИЙ ТРУДА И СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ ЛЕТНОГО СОСТАВА ГРАЖДАНСКОЙ АВИАЦИИ

¹ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 12а м/р, 3, г. Ангарск, РФ, 665827;

²Иркутская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, м/р Юбилейный, 100, г. Иркутск, РФ, 664049

В статье представлена гигиеническая оценка условий труда летного состава воздушных судов (ВС) гражданской авиации (ГА), состояние профессиональной и общей заболеваемости. Дана характеристика основных производственных факторов, воздействующих на летный состав экипажей ВС в полете. Показано, что средние уровни звука и звукового давления, общей вибрации, параметры микроклимата в полете не соответствуют гигиеническим нормативам. Уровни барометрического давления, воздействующего на летный экипаж ВС, концентрации вредных