

7. Oleshchenko A.M., Surzhikov D.V., Bol'shakov V.V., et al. Evaluation of occupational factors influence on health of workers engaged into coal industry and heat power engineering: methodic recommendations. — Kemerovo, 2003. — 28 p (in Russian).

Поступила 16.03.2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Олещенко Анатолий Михайлович (Oleshchenko A.M.), зам. дир. по науч. раб., нач. отд. экологии человека ФГБНУ «НИИ КПГПЗ», д-р мед. наук. E-mail: ecologia_nie@mail.ru.

Захаренков Василий Васильевич (Zakharenkov V.V.), дир. ФГБНУ «НИИ КПГПЗ», д-р мед. наук, проф. E-mail: vasily.zaharenkov@mail.ru.

Суржиков Дмитрий Вячеславович (Surzhikov D.V.), зав. лаб. прикл. гиг. иссл. ФГБНУ «НИИ КПГПЗ», д-р биол. наук, доцент. E-mail: ecologia_nie@mail.ru.

Кислицына Вера Викторовна (Kislitsyna V.V.), зав. лаб. экол. и гиг. окр. среды ФГБНУ «НИИ КПГПЗ», канд. мед. наук. E-mail: ecologia_nie@mail.ru.

Корсакова Татьяна Георгиевна (Korsakova T.G.), вед. науч. сотр. лаб. прикл. гиг. иссл. ФГБНУ «НИИ КПГПЗ», канд. биол. наук. E-mail: ecologia_nie@mail.ru.

УДК 546,57:539.2:616.8-091.8

Е.А. Титов^{*1}, М.А. Новиков¹, Л.М. Соседова²

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ CASPASE-3 И BCL-2, КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АРГЕНТУМАРАБИНОГАЛАКТАНА

¹ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 12а мкр, д. 3, г. Ангарск, Россия, 665827

²ФГБУН «Иркутский научный центр СО РАН», ул. Лермонтова, д. 134, Иркутск, Россия, 664033

В работе представлены результаты по экспериментальному моделированию воздействия наночастиц серебра, инкапсулированных в природную полимерную матрицу арабиногалактана, на ткань головного мозга белых беспородных крыс. Крысам парентерально вводили наночастицы серебра, инкапсулированные в полимерную матрицу арабиногалактана в дозе 100 и 500 мкг серебра на килограмм массы тела животного. Исследовали экспрессии двух белков участвующих в процессе апоптоза, по митохондриальному типу активации — caspase-3 и белок bcl-2, в динамике эксперимента в обследованных группах отмечается выраженный дозо — зависимый эффект экспрессии белка bcl-2 и увеличение числа caspase-3-экспрессированных и не экспрессированных гиперхромных клеток при воздействии аргентумарабиногалактана, что свидетельствует о нарушениях структуры клетки и развитии процесса апоптоза.

Ключевые слова: апоптоз, нейроны, наночастицы серебра, арабиногалактан.

E.A. Titov¹, M.A. Novikov¹, L.M. Sosodova². **Expression of caspase-3 and bcl-2 proteins as an indicator of functional state of brain tissue in white rats exposed to argentumarabinogalactane**

¹Federal State Budgetary Scientific Institution «East-Siberian Institution of Mediko-Ecological Researches», neighborhood 12a, 3, Angarsk, Russia, 665827

²Federal State Institution of Science «Irkutsk Scientific Center», st. Lermontov, 134, Irkutsk, Russia, 664033

The article presents results on experimental modelling an influence of silver nanoparticles incorporated into natural polymer arabinogalactane matrix on brain tissue of white outbred rats. The rats underwent parenteral injection of silver nanoparticles incorporated into polymer arabinogalactane matrix (dosage of 100 and 500 micrograms of silver per kg of the animal weight). The studies covered expression of 2 proteins participating in apoptosis process, in mitochondrial activation type — caspase-3 and protein bcl-2. During experiment, the groups examined demonstrated significant dose-dependent effect of bcl-2 protein expression and increased number of caspase-3 expressed and non-expressed hyperchromic cells under exposure to argentumarabinogalactane — that indicates disorders of cellular structure and apoptosis development.

Key words: apoptosis, neurons, silver nanoparticles, arabinogalactane.

*Лауреат конкурса молодых ученых XIII Всероссийского Конгресса с международным участием «Профессия и Здоровье»

Разработка и использование новых лекарственных средств адресной доставки, содержащих наночастицы различных металлов, приобретает все большее значение для фундаментальной и практической медицины [2]. Одним из наиболее интересных и перспективных материалов для разработки antimicrobial лекарственных средств адресной доставки являются наноконкомпозиты серебра, инкапсулированные в различные природные и синтетические полимерные матрицы [1,3]. Все более широкое использование наночастиц в промышленности и фармакологии обуславливает возрастание интереса к токсикологическим аспектам действия наночастиц на живую ткань. Одним из наиболее интересных направлений нанотоксикологии является оценка биологического ответа организма на действие наноконкомпозитов [4,5].

Целью данной работы явилось изучение показателей функционального состояния ткани головного мозга белых крыс при воздействии наночастиц серебра, заключенных в полимерную матрицу арабиногалактана.

Материалы и методы. Работа выполнена на 36 беспородных белых крысах-самцах трехмесячного возраста с массой от 240 до 280 г. Животные были разделены на три группы. Животным первой опытной группы (24 особи) внутривенно через зонд на протяжении 9 дней вводили водный раствор аргентумарабиногалактана из расчета 100 мкг серебра на килограмм массы животного (нАГ100). Животные второй группы (24 особи) получали водный раствор аргентумарабиногалактана из расчета 500 мкг серебра на килограмм массы животного (нАГ500). Животные контрольной группы (24 особи) получали на протяжении 9 дней внутривенно 0,5 мл дистиллированной воды и были усыплены в сроки, соответствующие опытным группам. Часть животных из каждой группы усыплялась сразу после окончания исследования, вторая часть — спустя 6 месяцев после окончания экспозиции.

После декапитации головной мозг от каждого исследуемого животного был извлечен и фиксирован в нейтральном растворе формалина (10%), обезвожен этанолом восходящей концентрации (70, 80, 90, 95 и 100%) и помещен в гомогенизированную парафиновую среду для гистологических исследований HistoMix (BioVitrum, Россия). Далее приготовленные с помощью микротомы МС-2 (Россия) срезы толщиной

4–5 мкм окрашивались на обычных гистологических предметных стеклах гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии. Дополнительно для визуализации нервных клеток проводили окраску по Нисслю. Исследование полученных срезов осуществляли при помощи светооптического исследовательского микроскопа Olympus BX 51 (Япония) с вводом микроизображений в компьютер при помощи камеры Olympus.

Для исследования биологического ответа организма на субклеточном уровне применяли иммуногистохимический метод определения активности проапоптотического белка caspase-3 и антиапоптотического белка bcl-2. Полученные на микротоме срезы были помещены на полизиновые стекла (Menzel, Германия) и окрашены на антитела к белку caspase-3 и bcl-2 (Monosan, Нидерланды) в соответствии с протоколом, предложенным производителем. Окрашенные срезы заключались в полистирол. Далее при помощи системы микроскопии и анализа Image Score S были проанализированы заранее выбранные параметры анализа полученных фотоматериалов: общее количество нейронов на единицу площади, количество гиперхромных нейронов, количество нормальных нейронов с экспрессией и без экспрессии проапоптотического белка caspase-3 и антиапоптотического белка bcl-2. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0» (Statsoft Inc., США). Статистическую значимость различий в независимых выборках определяли по методу Манна — Уитни. Достигнутый уровень значимости признаков — при $p < 0,05$.

Результаты. Гистологический анализ структуры ткани головного мозга животных, подвергавшихся воздействию аргентумарабиногалактана, показал незначительное набухание проводящих пучков в корковой и подкорковой областях и развитие незначительных периваскулярных отеков.

Электронномикроскопический анализ структуры нейронов коры головного мозга выявил деформацию ядер нейронов, с развитием в ряде случаев кариорексиса в отдаленном периоде обследования (рис.).

Для оценки воздействия исследуемого нанобиоконкомпозита на клеточном и субклеточном уровне было проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии белков проапоптотического белка caspase-3 и антиапоптотического белка bcl-2. В качестве ин-

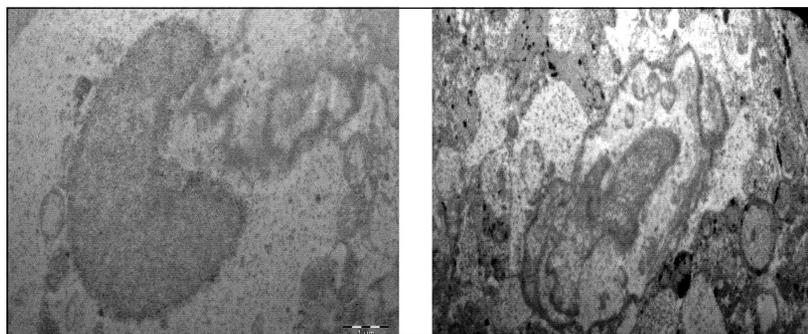


Рис. Деформация ядра нервных клеток коры головного мозга белых крыс при воздействии аргентумарабиногалактана. Ув. $\times 6400$

формативных показателей были выбраны следующие: число погибших клеток с наличием экспрессии белка, число нормальных клеток с наличием экспрессии белка, число погибших клеток без экспрессии белка, число клеток в нормальном состоянии без наличия экспрессии белка.

Иммуногистохимическая оценка экспрессии белка — ингибитора апоптоза bcl-2 в 1-м сроке обследования показала, что при введении НАГ100 происходит статистически значимое, по сравнению с контролем, увеличение процентного содержания погибших нейронов. Увеличение числа погибших клеток с экспрессией bcl-2 может быть вызвано возникновением и развитием процессов, препятствующих развитию апоптоза, что, однако, не помогло предохранить клетки от гибели. Так же на активацию процесса апоптоза указывает достоверное увеличение содержания нормальных нейронов с экспрессией bcl-2, что, вероятно, также говорит о мобилизации защитных механизмов клетки. За счет возрастания процентного содержания вышеуказанных клеток наблюдается компенсаторное снижение числа клеток, без экспрессии bcl-2 (табл. 1).

При обследовании в отдаленном периоде число погибших нейронов как с экспрессией, так и без нее статистически не отличалось от контрольной группы, однако число нормальных клеток с экспрессией bcl-2 значительно превышало контрольные значения. Сохранение экспрессии bcl-2 в отдаленном постконтакт-

ном периоде, вероятно, указывает на продолжающееся течение процесса апоптоза (см. табл. 1).

При исследовании ткани головного мозга животных, подвергавшихся воздействию НАГ500, в 1-м сроке обследования значимого различия между изучаемыми показателями не выявлено. Учитывая, что число клеток с экспрессией и без нее одинаково, можно предположить, что гибель нейронов происходила в равной степени как от апоптоза, так и по ряду других факторов. В то же время в отдаленном постконтактном периоде отмечается увеличение гиперхромных клеток и нормальных нейронов с экспрессией белка, и снижение числа клеток без экспрессии белка, что, вероятно, указывает на нарастание процесса апоптоза в ткани в отдаленном постконтактном периоде, и как следствие, нарастание протективной активности анти-апоптотического белка bcl-2 (см. табл. 1).

В итоге можно предположить, что при воздействии НАГ500 в динамике эксперимента имеет место отсроченная клеточная реакция на воздействие, выражающееся в увеличении числа экспрессированных клеток в отдаленном постконтактном периоде.

Таким образом, в отдаленном постконтактном периоде обследования при изучении экспрессии белка bcl-2 наблюдается выраженный дозозависимый эффект, выражающийся в изменении всех изучаемых показателей при воздействии аргентумарабиногалактана в дозе 100 и 500 мкг. Иначе говоря, экспрессия защитного белка bcl-2 увеличивается с течением времени,

Таблица 1

Экспрессия bcl-2 при воздействии НАГ100 и НАГ500 в динамике обследования (число клеток в 0,2 мм²). Med (Q₅ — Q₉₅) n=24

| Нейроны | Срок обследования | Контрольная группа | НАГ100 | НАГ500 |
|-----------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Гиперхромные с экспрессией | 1 | 0,59 (0,52–0,62) | 0,93 (0,53–1,68) | 0 (0–0) |
| | 2 | 1,65 (1,07–1,97) | 2,59 (2,15–3,5) * | 5,82 (4,16–7,2) * |
| Гиперхромные без экспрессии | 1 | 1,55 (1,24–1,6) | 3,35 (3,1–3,74) * | 0 (0–2,45) |
| | 2 | 1,63 (0,69–2,25) | 3,45 (2,64–4,69) | 7,27 (5,4–10,13) * |
| Нормальные с экспрессией | 1 | 2,07 (1,55–2,19) | 8,05 (6,83–8,89) * | 2,67 (0–3,57) |
| | 2 | 1,42 (1,12–1,95) | 8,05 (6,83–8,89) * | 7,26 (5,48–7,5) * |
| Нормальные без экспрессии | 1 | 97,19 (95,99–97,33) | 85,84 (84,11–88,54) * | 96,44 (95,45–97,89) |
| | 2 | 94,8 (93,26–95,61) | 85,84 (84,11–88,54) * | 79,46 (77,43–81,98) * |

Примечание к таблицам 1–2: * — различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при $p < 0,01$.

Таблица 2

Экспрессия caspase-3 при воздействии НАГ100 и НАГ500 в динамике обследования (число клеток в 0,2 мм²). Med (Q₅ — Q₉₅) n=24

| Нейроны | Срок обследования | Контрольная группа | НАГ100 | НАГ500 |
|-----------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Гиперхромные с экспрессией | 1 | 0,68 (0,52–0,96) | 1,1 (0,49–1,4) * | 2,74 (1,96–3,24) * |
| | 2 | 1,24 (0,97–1,74) | 3,82 (2,78–5,05) * | 6,37 (4,76–7,55) * |
| Гиперхромные без экспрессии | 1 | 1,68 (1,49–2,05) | 3,2 (2,76–4,2) * | 4 (3,64–5,26) * |
| | 2 | 1,33 (1,16–1,45) | 3,03 (0,85–4,8) * | 8 (4,95–9,25) * |
| Нормальные с экспрессией | 1 | 1,93 (1,76–2,09) | 4,9 (2,34–12,8) * | 5,1 (3,18–8,24) * |
| | 2 | 1,45 (0,89–1,75) | 8,89 (6,25–31,24) * | 6,96 (5,71–9,52) * |
| Нормальные без экспрессии | 1 | 95,52 (94,61–95,67) | 87,21 (80,85–92,05) * | 87,8 (84,57–90,2) * |
| | 2 | 95,49 (94,93–96,75) | 84,02 (59,7–86,35) * | 79,12 (74,28–80,18) * |

что подтверждает сохраняющийся в отдаленном периоде процесс апоптоза. В связи с этим представляет интерес обследование содержания проапоптотического белка caspase-3, являющегося продуктом реакции каспаз, запускающей процесс апоптоза.

При исследовании экспрессии белка caspase-3, являющегося активатором апоптоза, в 1-м сроке обследования при воздействии НАГ100 и НАГ500 выявлено достоверное по сравнению с контролем изменение содержания всех типов исследуемых клеток. Отмечается сокращение количества нормальных нейронов без экспрессии caspase-3. В то же время количество гиперхромных и нормальных клеток с экспрессией caspase-3 значительно повысилось (табл. 2).

В отдаленном периоде обследования в обеих опытных группах число гиперхромных нейронов с экспрессией caspase-3 и без экспрессии было значимо выше контрольных значений, число нормальных клеток с экспрессией caspase-3 также было выше контрольного значения, а число нормальных нейронов без экспрессии было ниже контрольной группы (см. табл. 2). Данные изменения имели выраженный дозо-зависимый характер.

При обследовании опытных групп в динамике эксперимента отмечается увеличение числа caspase-3-экспрессированных и не экспрессированных гиперхромных клеток. Особенно ярко выражено нарастание гиперхромных клеток с экспрессией caspase-3 в отдаленном периоде экспозиции, что вероятно говорит о преобладании гибели клеток по типу апоптоза спустя 6 месяцев, после окончания воздействия. В совокупности со снижением числа нормальных нейронов на единицу площади, это, вероятно, свидетельствует о нарастании процесса апоптоза в отдаленном периоде.

Вывод. Воздействие наночастиц серебра, инкапсулированных в природную полимерную матрицу арабиногалактана, характеризуется в основном внутриклеточными нарушениями: как структуры клетки (повреждение ядра), так и ее функционального состояния (развитие процесса апоптоза).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (см. REFERENCES стр. 2–5)

1. Дубровина В.И., Медведева С.А. и др. // Фармация. — 2001. — № 5. — С. 26–27.

REFERENCES

1. Dubrovina V.I., Medvedeva S.A., et al. // Farmacija. — 2001. — 1. — P. 26–27 (in Russian).
2. Chin-Lin Huang, I-LunHsiao, Ho-ChenLin, Chu-FangWang, Yuh-JeenHuang, Chun-YuChuang. Silver nanoparticles effect on gene expression of inflammatory and neurodegenerative responses in mouse brain neural cells // Environmental Research. — 2015. — №136. — P. 253–263
3. Prozorova G.F., Pozdnyakov A. S., Kuznetsova N. P. et al. // International J of Nanomedicine. — 2014. — №9. — 1883.
4. Sahoo S.K., Parveen S., Panda J.J. // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. — 2007. — №3. — P. 20–31.
5. Titov E.A., Novikov M.A., Sosedova L.M. / Effect of silver nanoparticles encapsulated in a polymer matrix on the structure of nervous tissue and expression of caspase — 3 // Nanotechnologies in Russia. — 2015. — № 10. — P. 640–644.

Поступила 15.03.2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Титов Евгений Алексеевич (Titov E.A.),

ст. науч. сотр. лаб. биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Вост.-Сиб. институт медико-экологических исследований», канд. биол. наук. E-mail: G57097@yandex.ru.

Новиков Михаил Александрович (Novikov M.A.),

мл. науч. сотр. лаб. биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Вост.-Сиб. институт медико-экологических исследований». E-mail: novik375@bk.ru.

Соседова Лариса Михайловна (Sosedova L.M.),

вед. науч. сотр. отд. инновац. м-лов и технологий для фармацевтики и мед. ФГБУН «Иркутский научный центр СО РАН», д-р мед. наук. E-mail: sosedlar@mail.ru.