

УДК 615.099:546.55/.59

АКТИВНОСТЬ АПОПТОЗА В НЕРВНОЙ ТКАНИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АРАБИНОГАЛАКТАНА НАНОСЕРЕБРА

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

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт
медико-экологических исследований»,
665827, г. Ангарск, Российская
Федерация

В статье представлены результаты оценки процесса апоптоза в нейронах белых крыс методом ДНК-комет и иммуногистохимическим анализом определения активности про/антиапоптотических белков caspase 3 и bcl-2 при воздействии нанобиокомпозита, представляющего собой наносеребро, встроенное в матрицу природного полимера-арабиногалактан. В препаратах нервной ткани крыс, подвергшихся воздействию арабиногалактаном наносеребра, установлено статистически значимое увеличение содержания ДНК в хвостах комет. ДНК-кометы с содержанием ДНК в хвосте более 70%, которые можно было бы рассматривать как апоптотические, в исследованных препаратах не наблюдались. Результаты, полученные при иммуногистохимическом определении экспрессии в нейронах анти/проапоптотических белков bcl-2 и caspase-3, наоборот, свидетельствуют о развитии процесса апоптоза в нервных клетках. Сравнивая результаты проведенного исследования, можно сделать заключение о более эффективном выявлении процесса апоптоза при помощи иммуногистохимических методов определения экспрессии анти/проапоптотических белков, чем методом ДНК-комет.

Ключевые слова: арабиногалактан наносеребра, белые крысы, апоптоз, генотоксичность, caspase 3, bcl-2, ДНК-кометы.

Введение. В последние годы благодаря своим уникальным свойствам наночастицы нашли широкое применение в различных областях. Антибактериальные и противогрибковые свойства наночастиц серебра (nAg) позволяют использовать их при производстве одежды, косметики, перевязочного материала, освежителей воздуха, солнцезащитных и гигиенических средств, контейнеров для пищевых продуктов, для дезинфекции воды [1]. Антимикробная способность nAg связана с их сильной окислительной активностью и высвобождением ионов серебра. Однако данные частицы индуцируют окислительное повреждение клеточной мембраны и органелл, в том числе лизосом, митохондрий и ядра, способны вызывать повреждения ДНК, что обуславливает ряд негативных последствий, таких как, цито- и генотоксичность, иммунологические реакции и может привести к развитию апоптоза или некроза клетки [2,3].

Для снижения уровня побочных эффектов и токсичности, пролонгирования действия, увеличения избирательности воздействия создаются новые препараты, основанные на иммобилизации nAg на полимерных матрицах – нанобиокомпозиты. В качестве матрицы в последние годы активно используется природный полимер из лиственницы сибирской – арабиногалактан (АГ) [4].

В наших предыдущих исследованиях по воздействию нанобиокомпозита – арабиногалактана наносеребра (nAg-АГ) на мозг белых крыс с помощью иммуногистохимического метода (ИГХ) выявлены нейроны с повышенной экспрессией белка bcl-2, одной из функций которого, является предотвращение запуска процесса апоптоза, что может быть связано с начавшейся в этих клетках мобилизацией защитных механизмов [5].

Известно, что метод ДНК-комет также позволяет выявить наличие апоптотических клеток

Соседова Лариса Михайловна (Sosedova Larisa Mikhailovna), д.м.н., проф., зав.лабораторией биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация, sosedlar@mail.ru
Капустина Екатерина Александровна (Kapustina Ekaterina Aleksandrovna), к.м.н., научный сотрудник лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация, tox_lab@mail.ru
Новиков Михаил Александрович (Novikov Mikhail Aleksandrovich), м.н.с., лаборатории биомоделирования и трансляционной медицины ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, г. Ангарск, Российская Федерация, novik-imt@mail.ru

[6]. Для более полной и информативной оценки процесса апоптоза в нейронах при воздействии нанобиокомпозита представляет интерес сопоставление метода ДНК-комет и ИГХ анализа, что позволит оценить одну из патогенетических сторон программируемой гибели клетки.

Целью исследования являлось изучение поврежденности ДНК, а также активности белков апоптоза caspase 3 и bcl-2 в нервных клетках белых крыс, подвергавшихся воздействию арабиногалактана наносеребра.

Материалы и методы исследования. В состав nAg-АГ входят частицы серебра в нульвалентном состоянии, стабилизированные АГ, находящимся в аморфной фазе. Параметры ячейки серебра-0,4 нм. Частицы серебра имеют сферическую форму, размер варьируется от 3 до 27 нм. Нанобиокомпозит является узкодисперсным: доля частиц с размерами в интервале 6-12 нм составляет 80%, содержание серебра – 16,73%. Молекулярная масса около 12 кДа. Вещество было синтезировано в институте химии имени А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск, Россия) [7,8].

Для проведения исследования из вивария ФГБНУ «ВСИМЭИ» получены нелинейные белые крысы-самцы в трёхмесячном возрасте массой 200-240 г, которые были разделены на четыре группы по 8 особей.

Животным первой и второй групп внутрижелудочно через зонд на протяжении 9 дней вводили водный раствор nAg-АГ из расчёта 100 мкг и 500 мкг серебра на килограмм массы соответственно (nAg-АГ 100 и nAg-АГ 500). Белые крысы третьей группы получали в эквивалентных количествах раствор АГ, особи четвертой (контрольной) группы – дистиллированную воду.

На следующий день после последнего введения испытуемых растворов животных декапитировали, быстро извлекали головной мозг, 200 мг ткани которого использовали для дальнейшего анализа методом ДНК-комет согласно методике [9]. Окраска препаратов осуществлялась SYBR Green I, регистрацию проводили на микроскопе «OLYMPUS BX-52», совмещенном с цифровой камерой «OLYMPUS RX-420» при увеличении «x100». Изображения ДНК-комет (по 100 клеток от каждого животного) анализировали с помощью программы «CASP 1.2.2». В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание фрагментов ДНК в хвосте комет.

Иммуногистохимическое исследование активности белков проводили с помощью моноклональных антител (Lab Vision Corporation, США) и вторичных антител, конъюгированных с полимером и пероксидазой (Lab Vision

Corporation). Визуализацию прореагировавших первичных антител производили при помощи хромогена DAB+ (Lab Vision Corporation). Выявление экспрессии осуществляли на парафиновых срезах. Для этого осуществляли депарафинизацию срезов по общепринятой методике: препараты опускали в ксилол на 10 мин, затем в 96° спирт на 5-6 мин, в 70°-80° спирт на 2-3 мин, после чего промывали образец погружением в дистиллированную воду на 10 мин. Затем для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывали 3% перекисью водорода в течение 5-10 мин. По окончании этой процедуры срезы помещали в 1xPBS (pH 7,5) на 5-10 мин, для блокирования неспецифического фонового окрашивания обрабатывали 5% BSA в течение 10 мин. При последующем нанесении первичных моноклональных антител предметные стекла помещали во влажную камеру для предотвращения высыхания препаратов и, как следствие, развития неспецифической фоновой реакции, ставили в хладотермостат (t= 4-8°C) на 18 часов. После этого срезы помещали в 1xPBS на 5 мин. Далее на образцы наносили вторичные антитела и оставляли при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего излишки антигена удаляли погружением срезов в 1xPBS на 5 мин. На следующем этапе проводили обработку конъюгатом стрептавидина и пероксидазой в течение 15 мин, с последующей промывкой препаратов в 1xPBS в течение 5 мин. Далее на срезы наносили хромоген DAB+ для визуализации окрашенного продукта, контролируя степень окраски под микроскопом. После достижения оптимального уровня окрашивания препараты промывали дистиллированной водой в течение 10-15 мин, после чего проводили подкрашивание толуидиновым синим в течение 5 мин. После промывания дистиллированной водой в течение 1 минуты срезы помещали в 96° спирт для дифференцировки окрашивания нейронов. На заключительном этапе препараты обезвоживали в абсолютном этаноле и в смеси этанола с орто-ксилолом 1:1 по 2-3 мин в каждом реагенте. Просветляли в орто-ксилоле и заключали в полистирол.

Результаты обрабатывали с использованием критерия Краскела-Уоллиса для несвязанных групп, критерия Вилкоксона для связанных выборок и критерия Манна-Уитни с применением ППП «STATISTICA 6.1» (StatSoft). При иммуногистохимическом исследовании отличия считали статистически значимыми при значении $p < 0,01$, при исследовании генотоксичности – $p < 0,02$ с учетом поправки Бонферрони.

Все животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к во-

Таблица 1

Содержание ДНК в хвосте комет нейронов коры головного мозга белых крыс

Группы	%ДНК в хвосте комет, Me(Q ₂₅ -Q ₇₅)	min-max	p при сравнении с контролем
Контроль	0,43(0,07-1,97)	0,01-18,19	
АГ	0,46(0,06-2,27)	0,01-15,02	0,92
nAg-АГ100	12,0(5,69-19,91) *	0,01-58,99	0,001
nAg-АГ500	5,47(2,01-9,02) *	0,01-46,87	0,000002

Примечания:* - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при $p < 0,01$; Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна-Уитни.

де и пище. Исследования проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Приказ МЗСР РФ № 708н от 23.08.2010 г.).

Результаты и обсуждение. Исследование поврежденности ДНК в нейронах коры головного мозга экспериментальных животных выявило, что процентное содержание ДНК в хвостах комет у особей, получавших АГ, и контрольных не имело различий (табл.1).

Однако у крыс обеих групп, подвергшихся воздействию nAg-АГ, выявлено статистически значимое увеличение содержания ДНК в хвостах комет и, следовательно, поврежденность ДНК. При сравнении групп nAg-АГ100 и nAg-АГ500 выявлен больший уровень деструкции ДНК у особей в первой группе ($p=0,0002$).

Следует отметить, что в исследованных препаратах не наблюдались ДНК-кометы с содержанием ДНК в хвосте более 70% (табл.1), которые можно было бы рассматривать как апоптотические [6]. ДНК-кометы характерной формы (апоптотические «ежики») встречались в образцах нервной ткани в единичных количествах, как в контрольной, так и опытных группах.

Проведенное иммуногистохимическое исследование экспрессии в нейронах белка bcl-2, являющегося ингибитором процесса апоптоза в клетке, выявило, что в группе nAg-АГ100 наблюдалось статистически значимое увеличение процентного содержания живых клеток, в которых обнаружены признаки повышенной экспрессии данного белка, а также уже погибших нейронов с повышенной экспрессией bcl-2 (табл.2). Обращает на себя внимание тот факт, что подобные изменения не обнаружены в группе nAg-АГ500.

При исследовании экспрессии в нервных клетках головного мозга белка caspase-3, который, напротив, является активатором апоптоза, наблюдалось статистически значимое увеличение процентного содержания живых и погибших клеток, экспрессирующих данный белок: в группе nAg-АГ100, по сравнению с группой АГ, а группе nAg-АГ500 – эти изменения значимы по сравнению с контрольными значениями и с группой АГ. Полученные результаты свидетельствовали о том, что в погибших и живых нейронах экспрессия данного апоптотического белка происходит или происходила усиленно, что привело к гибели одних, и регистрации повышенного уровня белка в других (табл.2)

Выявленные результаты экспрессии caspase-3 позволяют предположить активацию апоптотических процессов в нейронах уже на 10-й день после окончания воздействия нанобиокомпозиата. Это сочетается с данными экспрессии ингибитора апоптоза bcl-2, который в ответ на активацию апоптотического процесса начинает в эти же сроки оказывать протективное действие, особенно выраженное при воздействии nAg-АГ100. Считаю необходимым отметить отсутствие достоверных различий в экспрессии изучаемых белков в группе животных, получивших в эквивалентных количествах раствор АГ, т.е. собственно матрица (арабиногалактан) не оказывала влияния на индукцию апоптоза в клетках головного мозга.

Таким образом, в представленном исследовании у животных, подвергавшихся воздействию nAg-АГ, выявлен повышенный уровень поврежденности ДНК в клетках головного мозга, что позволяет свидетельствовать о на-

Таблица 2

Экспрессия bcl-2 и caspase-3 при воздействии АГ, nAg-АГ100 и nAg-АГ500 (% от общего количества клеток в 0.2 мм²), Med (Q₂₅ – Q₇₅), n=10

Группы	Bcl-2		Caspase-3	
	Погибшие клетки с экспрессией белка	Живые клетки с экспрессией белка	Погибшие клетки с экспрессией белка	Живые клетки с экспрессией белка
контроль	0,59 (0,52-0,62)	2,07 (1,55-2,19)	0,68 (0,52-0,96)	1,93 (1,76-2,09)
АГ	0,57 (0,43-0,99)	3,89 (2,46-5,92)	0,33 (0-0,67)	1,92 (1,66 -2,1)
nAg-АГ100	0,93 (0,53-1,68) ♦	5,04 (4,3-5,35)* ♦	1,1 (0,49-1,4)♦	4,9 (2,34-12,8)♦
nAg-АГ500	0 (0-0)	2,67 (0-3,57)	2,74 (1,96-3,24)* ♦	5,1 (3,18-8,24)*♦

Примечание:* - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при $p < 0,01$; ♦ - различия статистически значимы по сравнению с группой АГ при $p < 0,01$. Статистическая значимость рассчитывалась по критерию Манна-Уитни.

личии генотоксического эффекта. Причем при воздействии меньшей дозы nAg-АГ100 содержание ДНК в хвосте комет клеток головного мозга белых крыс встречалось значимо (более чем в 2 раза) чаще, чем при введении дозы nAg-АГ500. То есть в данном случае наблюдалась парадоксальная генотоксичность: нарушение принципа «доза-эффект», когда меньшая доза (концентрация) вызывает больший эффект, чем существенно более высокая. Вместе с тем, невысокая степень содержания ДНК в хвостах комет не позволяет однозначно предполагать о развитии процесса апоптоза в нервных клетках.

Наряду с этим результаты, полученные при иммуногистохимическом определении экспрессии в нейронах анти/проапоптотических белков bcl-2 и caspase-3 свидетельствуют об обратном. Наносеребро, инкапсулированное в полимерную матрицу, при подостром введении в организм экспериментальных животных способно индуцировать в нейронах коры головного мозга запуск апоптотического каскада. Установлено, что после девятикратного введения обеих доз nAg-АГ в клетках нервной ткани головного мозга белых крыс резко возрастает количество нейронов, продуцирующих белок caspase-3, достоверное по отношению к результатам групп с введением чистого АГ, так и контрольной.. Наряду с этим у крыс, получивших nAg-АГ100, отмечалось значимое возрастание количества нейронов, экспрессирующих bcl – 2, однако, активности данного

антиапоптотического белка в нейронах коры головного мозга не хватает для предотвращения апоптоза и формирования внутриклеточных защитных механизмов. Обращает на себя внимание факт отсутствия повышения экспрессии белка bcl – 2 при воздействии дозы nAg-АГ500, что может быть связано с подавлением активности данного белка в ответ на введение большей дозы наносеребра, наряду с резким возрастанием внутриклеточной продукции апоптотического белка caspase-3, свидетельствующего о запуске механизмов модуляции процесса апоптоза.

Заключение. Сравнивая результаты проведенного исследования можно предварительно сделать заключение, что при данных условиях моделирования более эффективным является выявление процесса апоптоза при помощи иммуногистохимических методов определения экспрессии анти/проапоптотических белков, чем методом ДНК-комет. Учитывая, что в данных исследованиях проведено подострое введение nAg, можно предположить, что процесс апоптоза находится на ранней стадии своего развития, тогда как деградация ДНК происходит на заключительных этапах апоптотического процесса.

В целом представленные результаты свидетельствуют о сохранении токсических свойств nAg даже при заключении их в матрицу арабиногалактана, что подтверждается и с данными ранее выполненного гистологического обследования [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chin-Lin H., I-Lun H., Ho-Chen L., Chu-Fang W., Yuh-Jeen H., Chun-Yu Ch.* Silver nanoparticles affect on gene expression of inflammatory and neurodegenerative responses in mouse brain neural cells. // *Environmental Research*. 2015; 136: 253-263.
2. *Tianlu Z., Liming W., Qiang C., Chunying C.* Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. *Yonsei Med J.* 2014; 55 (2): 283-2
3. *Danielle McShan, Paresh C., Ray Hongtao Yu.* Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver. // *J. Food Drug Anal.* 2014; 22(1): 116-127.
4. *Medvedeva S., Aleksandrova G., Grischenko L.* Transformation of larch polysaccharide. The 11th Intern.Symp.

- on Wood Pulp Chem. Nice, France. 2001; II: 123-126.
5. *Novikov M.A.* Expression of apoptosis protein bcl-2 in nerve cells induced by silver nanoparticles encapsulated in polymer matrix. Second International school-conference «Applied nanotechnology and nanotoxicology» (ANT 2013). August 15-19, 20Listvyanka, Baikal Lake, Irkutsk Region.
6. *Чаушева А.И., Никитина В.А., Жанатаев А.К., Дурнев А.Д., Бочков Н.П.* ДНК повреждения в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках человека при разных сроках культивирования. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.

- 2011; VI(4): 39-41.
7. *Shurygina I.A., Sukhov B.G., Fadeeva T.V., Umanets V.A., Shurygin M.G., Ganenko T.V., Kostyrov Y.A., Grigoriev E.G., Trofimov B.A.* Bactericidal action of Ag(0)-antithrombotic sulfated arabinogalactan nanocomposite: coevolution of initial nanocomposite and living microbial cell to a novel nonliving nanocomposite// *Nanomedicine. Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2011; 7: 827-833.
8. *Trofimov B.A., Sukhov B.G., Aleksandrova G.P., Medvedeva S.A., Grishchenko L.A., Malkina A.G., et al.* Nanocomposites with magnetic, optical, catalytic, and biologically active

- properties based on arabinogalactan. *Doklady Chemistry.* 2003; 393 (4-6): 287-288.
9. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. Методические рекомендации. М.; 2006.
10. *Соседова Л.М., Новиков М.А., Титов Е.А.* Морфо-функциональная оценка эффектов действия наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу. Актуальные проблемы транспортной медицины. 2014; (37): 77-83.

REFERENCES:

1. *Chin-Lin H., I-Lun H., Ho-Chen L., Chu-Fang W., Yuh-Jeen H., Chun-Yu Ch.* Silver nanoparticles affect on gene expression of inflammatory and neurodegenerative responses in mouse brain neural cells. // *Environmental Research*. 2015; 136: 253-263.
2. *Tianlu Z., Liming W., Qiang C., Chunying C.* Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. *Yonsei Med J.* 2014; 55 (2): 283-2
3. *Danielle McShan, Paresh C. Ray Hongtao Yu.* Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver. // *J. Food Drug Anal.* 2014; 22(1): 116-127.
4. *Medvedeva S., Aleksandrova G.,*

- Grischenko L.* Transformation of larch polysaccharide. The 11th Intern.Symp. on Wood Pulp Chem. Nice, France. 2001; II: 123-126.
5. *Novikov M.A.* Expression of apoptosis protein bcl-2 in nerve cells induced by silver nanoparticles encapsulated in polymer matrix. Second International school-conference «Applied nanotechnology and nanotoxicology» (ANT 2013). August 15-19, 20Listvyanka, Baikal Lake, Irkutsk Region.
6. *Chausheva A.I., Nikitina V.A., Zhanataev A.K., Durnev A.D., Bochkov N.P.* DNA damage of multipotent mesenchymal stromal cells of the person at different

- stages of cultivation. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya.* 2011; VI(4): 39-41. (in Russian)
7. *Shurygina I.A., Sukhov B.G., Fadeeva T.V., Umanets V.A., Shurygin M.G., Ganenko T.V., Kostyrov Y.A., Grigoriev E.G., Trofimov B.A.* Bactericidal action of Ag(0)-antithrombotic sulfated arabinogalactan nanocomposite: coevolution of initial nanocomposite and living microbial cell to a novel nonliving nanocomposite// *Nanomedicine. Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2011; 7: 827-833.
8. *Trofimov B.A., Sukhov B.G., Aleksandrova G.P., Medvedeva S.A., Grishchenko L.A., Malkina A.G., et al.*

- Nanocomposites with magnetic, optical, catalytic, and biologically active properties based on arabinogalactan. *Doklady Chemistry.* 2003; 393 (4-6): 287-288.
9. Application of alkaline gel electrophoresis of isolated cells to assess genotoxic properties of natural and synthetic compounds. *Metodicheskie rekomendatsii.* M.; 2006. (in Russian)
10. *Sosedova L.M., Novikov M.A., Titov E.A.* Morpho-functional assessment of action effects of silver nanoparticles encapsulated in a polymer matrix. *Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny.* 2014; (37): 77-83. (in Russian)

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

ACTIVITY OF APOPTOSIS IN THE NERVE TISSUE OF WHITE RATS EXPOSED TO NANOSILVER ARABINOGALACTAN

East-Siberian Institute of Medico-Ecological Researches, 665827, Angarsk, Russian Federation

The article presents results of apoptosis evaluation in albino rat neurons using comet assay for DNA and immune histochemical analysis to determine the activity of pro- and anti-apoptotic proteins caspase 3 and bcl-2 at exposure to nano biocomposites representing nano silver embedded in a matrix of a natural arabinogalactan. In preparations of nervous tissue of rats exposed to nano silver arabinogalactan polymer, a statistically significant increase of DNA content in comet tails was found out. DNA comets with DNA tail content of more than 70%, which could be regarded as apoptotic have not been observed in investigated formulations. The results of the immune histochemical determination of expression of anti- and pro-apoptotic proteins bcl-2 and caspase-3 in neurons show on the contrary the development of apoptosis in nerve cells. Comparing results of the studies performed, a conclusion can be drawn that to detect the apoptosis process, immune histochemical methods for determination of anti- and pro-apoptotic proteins are more efficient than DNA comet assay.

Keywords: *nanosilver arabinogalactan, white rats, apoptosis, genotoxicity, caspase 3, bcl-2, DNA-comets.*

Переработанный материал поступил в редакцию 14.09.2015 г.